

**ÄNDERUNGEN IM PHOTOSYNTHESEMECHANISMUS
BEI ANZUCHT
HOMOKONTINUIERLICHER KULTUREN VON
SCENEDESMUS OBLIQUUS
IN STARK- UND SCHWACHLICHT**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

PHILIPP FLEISCHHACKER
aus Schweinfurt

Marburg/Lahn 1975

**ÄNDERUNGEN IM PHOTOSYNTHESEMECHANISMUS
BEI ANZUCHT
HOMOKONTINUIERLICHER KULTUREN VON
SCENEDESMUS OBLIQUUS
IN STARK- UND SCHWACHLICHT**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

PHILIPP FLEISCHHACKER

aus Schweinfurt

Marburg/Lahn 1975



Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

Als Dissertation angenommen am: 19.6.1975

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1975

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Senger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Wild

INHALT

	Seite
1. ALLGEMEINER TEIL UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. Grundlagen des Photosyntheseprozesses	1
1.2. Veränderungen des Chloroplasten unter Lichteinfluß	2
1.3. Die Dunkelreaktionen	3
1.4. Die Lichtreaktionen	4
1.4.1. Reaktionen um Photosystem II	7
1.4.2. Reaktionen um PS I	14
1.5. Elektronenfluß und Photophosphorylierung	19
1.6. Künstliche Elektronendonatoren und -Akzeptoren sowie Hemmstoffe der Photo- synthese	21
2. ZIELSETZUNG	26
3. METHODIK	28
3.1. Objekt und Anzucht	28
3.2. Bestimmung der Versuchsparameter	29
3.3. Photosynthetische Sauerstoffmessungen	30
3.4. Herstellung photosynthetisch aktiver Partikel	31
3.5. Messungen zur Photosystem II - Reaktion	31
3.6. Messungen zur " I - Reaktion	33
3.7. Pigmentanalyse	34
3.8. Bestimmung der Quantenausbeute	35
3.9. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung ganzer Zellen	36
3.10. Bestimmung der Enzymaktivität der Ribulose 1,5-Diphosphatcarboxylase	37
3.11. Cytochrombestimmung und Cyt f-Oxidation	40
3.12. Bestimmung des Chl/P ₇₀₀ -Verhältnisses in Subpartikeln	42
3.13. Absorptionsänderung bei 520 nm	45
3.14. Lichtinduzierte Konformations- und Volumenänderungen	45

3.15.	Homokontinuierliche Kulturen einzelliger Grünalgen	46
4.	EXPERIMENTELLER TEIL UND DISKUSSION	47
4.1.	Voruntersuchungen	47
4.2.	Charakterisierung einer Stark- und Schwachlichtkultur	54
4.2.1.	Pigmentanalyse	54
4.2.2.	Photosyntheseleistung	60
4.2.3.	Quantenausbeute der Photosynthese	62
4.3.	Teilreaktion der Photosynthese	64
4.3.1.	PS II- Reaktionen	64
4.3.1.1.	Hill-Reaktion mit p-Benzochinon und DCPIP	64
4.3.1.2.	Hemmstoffversuche mit DCMU und DBMIB	68
4.3.1.3.	DCPIP-Reaktion mit DPC als Elektronendonator	75
4.4.	PS I-Reaktionen	78
4.5.	Die Elektronentransportkette	83
4.5.1.	Poolgrößen der Redox-Überträger	83
4.5.2.	Lichtinduzierte Cyt f-Oxidationen	87
4.6.	Absorptionsänderungen bei 520 nm	94
4.7.	Lichtinduzierte Konformationsänderungen an Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus	96
4.8.	$^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung ganzer Zellen und RuDPC-ase-Aktivität	98
5.	SCHLUßFOLGERUNGEN	102
6.	ZUSAMMENFASSUNG	108
7.	LITERATUR	111

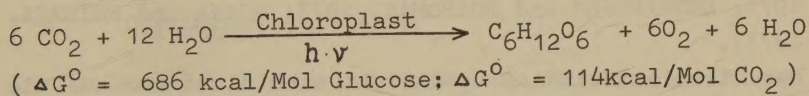
In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Asc	Ascorbat
DAD	2,2,5,6 -Tetramethyl-p-phenylendiamin
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1, 1-Dimethylharnstoff
DPC	Diphenylcarbазid
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
P ₇₀₀	Chlorophyll a _I im Reaktionszentrum von Photosystem I
P ₆₈₂	Chlorophyll a _{II} im Reaktionszentrum von Photosystem II
PGS	Phosphoglycerinsäure
PQ	Plastochinon
PQH ₂	Plastohydrochinon
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Q	Primärakzeptor von Photosystem II
RuDP	Ribulose-1,5-diphosphat
RuDPC-ase	Ribulose-1,5-diphosphatcarboxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X, P ₄₃₀	Primärakzeptor von Photosystem I
SW	Schwachlichtkulturen
ST	Starklichtkulturen

1. ALLGEMEINER TEIL UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Grundlagen des Photosyntheseprozesses

Im Photosyntheseprozess wird Strahlungsenergie in chemische Energie umgewandelt. Aus Kohlendioxyd und Wasser werden unter Sauerstoffentwicklung gegen das thermodynamische Energiegefälle Kohlenhydrate synthetisiert.

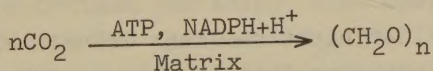


Der Photosyntheseapparat ist in den Chloroplasten lokalisiert.

Die Plastidenhülle ist für eine Reihe von Stoffwechselprodukten durchlässig. Überraschenderweise wurde in den letzten Jahren nachgewiesen, daß dies für das Endprodukt der Photosynthese nicht der Fall ist. Nach HELDT et al. (1973) ist die innere Plastidenhülle für Glucose impermeabel. Die Regelung des Stoffwechselaustausches zwischen Chloroplastenmatrix und Cytoplasma wird von HEBER (1974) ausführlich in einem Übersichtsartikel behandelt.

Die Chloroplastenhülle umschließt eine Matrix, das Stroma, und ein Lamellarsystem.

Im Stroma der Chloroplasten sind die Enzyme des Calvin-Zyklus, die für die CO_2 -Fixierung und Reduktion notwendig sind, gelöst. Da die CO_2 -Assimilierung nicht unbedingt lichtabhängig ist, bezeichnet man sie als Dunkelreaktion. Voraussetzung für den CO_2 -Einbau sind ATP und $\text{NADPH}+\text{H}^+$.



Die Energie- und Reduktionsäquivalente werden von zwei Lichtreaktionen unter Wasserspaltung geliefert.

Das System der Lichtreaktion ist im chlorophyllhaltigen

Lamellarsystem, den Thylakoiden, lokalisiert.

1.2. Veränderungen des Chloroplasten unter Lichteinfluß

Die Bildung des funktionsfähigen Chloroplasten erfolgt im Licht und korreliert mit der Biosynthese von Chlorophyll a. Die Photomorphogenese des Photosyntheseapparates ist in struktureller, wie auch in funktioneller Hinsicht Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (GOODWIN, 1971; HENNINGSSEN und BOARDMAN, 1973; OGAWA und SHIBATA, 1973).

Der Strahlungseinfluß beschränkt sich nicht nur auf die Ergrünungsphase. Hohe Lichtintensitäten während der Wachstumsphase verändern das Gefäßsystem höherer Pflanzen (BJÖRKMAN, 1972) und verringern die Chloroplastenzahl in Mesophyllzellen - ST-Typ Atriplex im Vergleich zu SW-Typen Alocasia, Cordyline und Lomandra longifolia - wie lichtmikroskopische Untersuchungen von GOODCHILD et al. (1972) ergaben.

SW-Chloroplasten sind groß, besitzen gutentwickelte Granastapel (GOODCHILD et al., 1972). Die Zahl der Membranlamellen in ST-Chloroplasten ist gering (BJÖRKMAN et al., 1972). BALLANTINE und FORDE (1970) geben für ST-Chloroplasten von Sojabohnen, die unter hohen Temperaturen kultiviert worden waren, die Zahl von 6-7 Lamellen, bestehend aus 2-3 zusammenliegenden Thylakoiden, an. REGER und KRAUSS (1970) finden in ST- Chlorella Thylakoide, die paarweise in Chloroplasten zusammenliegen. Der Gehalt an Stärke ist nach BALLANTINE und FORDE (1970) in SW-Chloroplasten höher als in ST-Chloroplasten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von REGER und KRAUSS (1970).

SW-Pflanzen bilden nicht nur mehr Granalamellen, sondern besitzen auch mehr Chlorophyll pro Chloroplastenvolumen (ANDERSON et al., 1973). Das Chlorophyll a/b-Verhältnis ist in ST-Pflanzen höher als in SW-Pflanzen

(GRAHL und WILD, 1972; BJÖRKMAN et al., 1972).

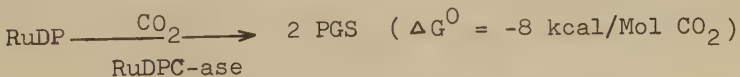
Carotinoide sind in Anacystis nidulans unter SW- Anzucht in gleichem Maße vorhanden, wie in ST- Algen. Bezieht man den Carotinoidgehalt auf den Chlorophyllanteil, so ist das Verhältnis bei Starklichtanzucht niedriger (ÖQUIST, 1974).

Carotinoiden wird eine schützende Funktion gegen etwaige Photooxidation des Chlorophylls zugeschrieben (KRINSKY, 1968).

1.3. Die Dunkelreaktionen

In den Dunkelreaktionen wird CO_2 mit Hilfe von ATP und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ fixiert und reduziert. Die enzymatischen Reaktionen sind weitgehend von der Arbeitsgruppe um CALVIN aufgeklärt worden.

Die Carboxylierung des Ribulose 1,5 - Diphosphats wird von dem "Schlüsselenzym" Ribulose 1,5 - Diphosphatcarboxylase (Carboxidismutase) katalysiert.



Die Frage, ob das Enzym RuDPC-ase mit "Fraktion I Protein" oder mit Teilen der Fraktion identisch sei, wird in einem Reviewartikel von KAWASHIMA und WILDMAN (1970) ausführlich diskutiert und darf mittlerweile wohl allgemein bejaht werden.

Die Aktivität der RuDPC-ase ist beim Enzymtest von vielen äußeren Faktoren abhängig.

So ermöglicht eine 10- millimolare Mg^{2+} - Konzentration eine maximale Aktivität mit einem pH-Optimum bei 7,8. Eine Änderung der Mg-Ionenkonzentration hat ein verschobenes pH-Optimum zur Folge. Eine Steigerung der Aktivität wird von CHU und BASSHAM (1974) durch die Vorincubierung des Enzyms mit 10 mM MgCl_2 und 1 mM Bicarbonat beschrieben. Die Zugabe von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wirkt zusätzlich aktivierend.

LAING et al. (1974) setzen die CO_2 -Fixierung von Blättern in Relation zur Temperatur, CO_2 - und O_2 -Konzentration. Hohe Temperaturen haben eine reduzierte CO_2 -Affinität verbunden mit einer höheren O_2 -Affinität zur Folge. Gereinigte RuDPC-ase weist eine Abnahme der Aktivität bei steigenden Sauerstoffkonzentrationen auf.

Vermutlich ist die RuDPC-ase nicht nur ein Regulativ der Photosynthese, sondern auch der Photorespiration.

Licht- und Schattenpflanzen zeigen deutliche Unterschiede in der Kapazität der CO_2 -Fixierung (BJÖRKMAN et al. 1972). Die Ursachen für diesen Tatbestand liegen einerseits in der höheren CO_2 -Konzentration in ST-Blättern, andererseits in der verstärkten RuDPC-ase-Aktivität (BJÖRKMAN, 1968). Die RuDPC-ase-Aktivität ist danach etwa doppelt so groß, wenn man den Meßwert auf Protein bezieht. Im Verhältnis RuDPC-ase / Chlorophyll liegt eine 5-6-fache Steigerung der ST- RuDPC-ase-Aktivität vor.

1.4. Die Lichtreaktionen

Nach dem allgemein akzeptierten, erstmals von HILL und BENDALL (1960) entwickelten Schema, besteht der photochemische Teil der Photosynthese bei höheren Pflanzen und Grünalgen aus zwei hintereinandergeschalteten Photosystemen, die den Elektronenfluß von Wasser nach NADP^+ gegen das thermodynamische Gefälle antreiben.

Neben der Bildung der Reduktionsäquivalente wird durch den Elektronenfluß ein Protonengradient an der Thylakoidmembran aufgebaut, der im Sinne der Mitchell-Hypothese der ATP-Bildung dient.

Bei der Anregung der Photosysteme werden Lichtquanten von Antennenpigmenten (Chlorophyll a und Chlorophyll b) absorbiert und durch Resonanzübertragung (FÖRSTER, 1948) in die aktiven Reaktionszentren II ($\text{Chl } a_{\text{II}} = \text{Chl } a_{682}$) und Reaktionszentren I ($\text{Chl } a_{\text{I}} = P_{700}$) geleitet.

Nach GOVINDJEE (1972) kann folgender Vorschlag für die Zusammensetzung der Pigmentsysteme als Arbeitshypothese verwandt werden (Fig. 1)

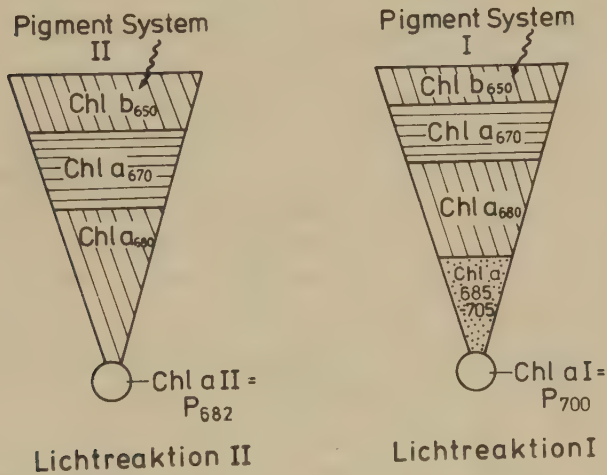


Fig. 1: Verteilung der Chlorophylle in beiden Photosystemen von Grünalgen und Höheren Pflanzen nach einem Vorschlag von GOVINDJEE (Aus: JACOBI, 1972)

Das längerwellig absorbierende Photosystem I mit dem Oxidans P_{700}^{+} überträgt die Elektronen auf ein Reduktans X^{-} (RUMBERG und WITT, 1964; KE, 1973). P_{700} wirkt als Redox-Partner in einem Ein-Elektronenübergang im Photosystem und besitzt ein Redox-Potential von $E_0 = 480$ mV.

Der Reaktionsmechanismus um Photosystem II ist aus meßtechnischen Gründen weitaus schwieriger aufzuklären.

Nach neueren Untersuchungen an Mn^{2+} -freien Chloroplasten gibt DÖRING (1975) der Redox-Reaktion gegenüber einer Sensibilisierungsaktion den Vorzug.

Das Zusammenwirken zweier Photosysteme wurde erstmals von HILL und BENDALL (1960) in einem Redox- Potential- diagramm schematisch dargestellt. Das Redox- Potential- schema wurde seitdem durch neue Befunde ergänzt und er- weitert.

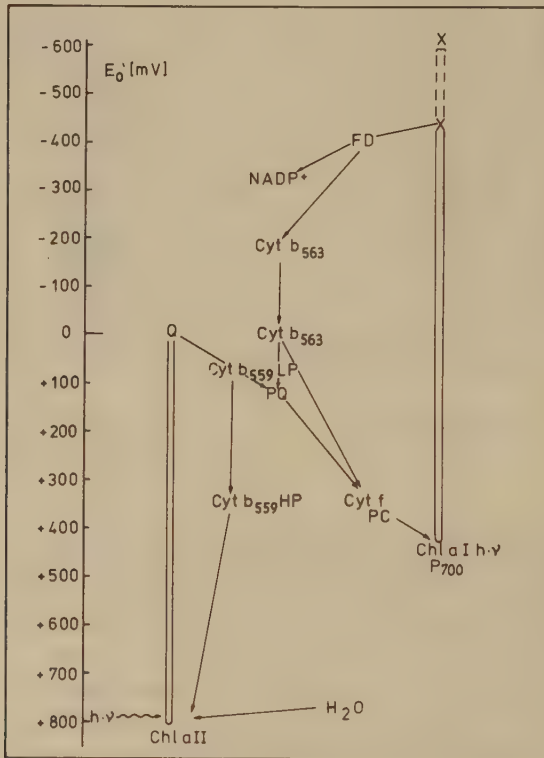


Fig. 2: Hill-Bendall-Diagramm des photosynthetischen Elektronentransportes (verändert).

Das Potentialdiagramm in Fig. 2 soll als Diskussions- grundlage für die folgenden Ausführungen dienen, ob- gleich man kritisch anmerken muß, daß man anhand des Potentialgefälles den Elektronenverlauf nicht unbedingt

verfolgen kann, da für einige Überträger der Elektronentransportkette unterschiedliche Redox- Potentiale in vitro bestimmt wurden.

1.4.1. Reaktionen um Photosystem II

Die Entwicklung der Modulation-Polarographie-Technik hat die Messung der Sauerstoffbildung nach Blitzlicht-anregung möglich gemacht (JOLIOT et al., 1971; KOK et al., 1970). Die Reaktionsmechanismen auf der oxidierenden Seite von Photosystem II sind aber noch weitgehend unbekannt.

Die Oxidation des Wassers zu molekularem Sauerstoff erfolgt nach dem hypothetischen Modell von KOK et al. (1970) in einem linearen 4-Quanten-Prozess.

Eine Reihe von Autoren fordern für das Verständnis der wasserspaltenden Reaktion eine Aktivierung der S_2 - und S_3 - Oxidationszustände des O_2 - entwickelnden Systems.

Entweder erfolgt die Aktivierung durch Elektronenüberträger der Transportkette zwischen Photosystem II und Photosystem I (VATER, 1973; RENGGER et al., 1973; INOUE et al., 1974) oder durch einen relativ großen, reduziert vorliegenden Pool (JOLIOT et al., 1971).

Vielfach wird ein zyklischer Elektronenfluß um PS II über Cyt b_{559} HP postuliert. Die Frage, ob auf diesem Wege eine Aktivierung der S_2 - und S_3 - Zustände erfolgt, kann nicht eindeutig beantwortet werden (HENNINGSEN und BOARDMAN, 1973; PLESNICAR und BENDALL, 1973).

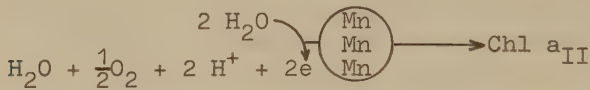
Die molekulare Ordnung des wasserspaltenden Systems, sowie die Lokalisation in der Thylakoidmembran, ist nicht aufgeklärt.

Die Kapazität der O_2 -Entwicklung kann nicht mit dem Chlorophyllgehalt des Chloroplasten oder einem "Thylakoid-stacking" in Zusammenhang gebracht werden (CHENIAE, 1970).

Der Enzymkomplex des wasserspaltenden Systems entwickelt sich im Licht (CHENIAE und MARTIN, 1973; CHENIAE,

1970: HENNINGSEN und BOARDMAN, 1973) und ist stark von Mangan- und Chloridionen abhängig (CHENIAE und MARTIN, 1973: IZAWA et al., 1969). Bei der Lichtaktivierung des O_2 - entwickelnden Systems wird ein Manganpool aufgebaut, der zwischen dem H_2O - spaltenden System und dem Reaktionszentrum interagiert. Der Mn-Pool besteht in Scenedesmus aus 5-8 Mn/200 PS II Chlorophyllmolekülen (CHENIAE, 1970).

Manganionen können zu 2/3 durch Tris-Behandlung oder Temperaturschock freigesetzt werden. Die Wasserspaltung ist dann nicht mehr funktionsfähig.



Eine gleiche funktionelle Reaktionsseite nimmt man für Cl^- an (IZAWA et al., 1969).

Die Elektronen, die infolge der Wasseroxidation frei werden, werden über ein Donorsystem dem Reaktionszentrum zugeführt. Sie werden dann in einer Redox- oder Sensibilisierungsreaktion auf ein um 0,8 V negativeres Potential angehoben und reduzieren einen unbekannten Akzeptor.

Den Elektronenakzeptor bezeichnen DUYSENS und SWEERS (1963) als "Quencher" (Q), da Q das Vermögen besitzt, die Fluoreszenz zu "quenchen"; d.h. zu löschen. Liegt Q in einer oxidierten Form vor, so kann der Akzeptor mittels einer Lichtreaktion reduziert werden, und die emittierte Fluoreszenz ist gering. Befindet sich Q andererseits im reduzierten Zustand, so können keine Elektronen abfließen, und der Fluoreszenzbetrag erhöht sich.

STIEHL und WITT (1969) diskutieren eine schnelle Absorptionsänderung bei 335 nm (320 nm) nach Blitzlichtanregung als den Primärakzeptor (X) von PS II. Es wird vermutet, daß X-335 (320) als Elektronenüberträger zwischen $Chl a_{II}$ und dem Plastochinonpool liegt und

im molekularen Aufbau möglicherweise ein Plastochinon darstellt (WITT, 1971).

Ein weiterer Elektronenakzeptor von PS II wird erstmals von KNAFF und ARNON (1969) diskutiert. Sie finden, inzwischen vielfach bestätigt, eine lichtinduzierte Absorptionsänderung bei 550nm relativ gegen 540 nm (546 - 543 bei tiefen Temperaturen) in Spinatchloroplasten und bezeichnen die nicht identifizierte Komponente als C-550 (ERIXON und BUTLER, 1971; BEARDEN und MALKIN, 1973; BENDALL und SOFROVA, 1971).

Nach neueren Ergebnissen soll C-550 nicht den primären Elektronenakzeptor darstellen, sondern ein membrangebundenes Pigment (möglicherweise β -Carotin), das den Oxidation - Reduktionszustand des Primärakzeptors A ($\hat{=}$ Q) anzeigt (KNAFF und MALKIN, 1974).

Aufgrund von Tieftemperaturversuchen wird eine Rückreaktion zwischen dem Reaktionszentrum Chl a_{II} und dem reduzierten Primärakzeptor A (A^-) - indiziert durch C-550 - postuliert (LOZIER und BUTLER, 1973; KNAFF und MALKIN, 1974; MATHIS und VERMEGLIO, 1974).

Neben der klassischen Hypothese eines Quenchers, die den Vorteil hat, in vivo Experimente zu interpretieren, werden seit kurzem mehrere Quenchemöglichkeiten der variablen Fluoreszenz beschrieben. Die Fluoreszenzlöschung ist nicht nur von Q abhängig, sondern auch vom Ladungszustand des Plastochinonpools (DELOSME, 1971; BAUER, 1972; JOLIOT und JOLIOT, 1973). Darüberhinaus diskutiert man die Möglichkeit der Einflußnahme des Elektronendonors auf die Fluoreszenzausbeute, da der Fluoreszenzbetrag für die photoinaktiven Zustände S'_0 und S'_1 höher ist als für die Stadien S'_2 und S'_3 (DELOSME, 1971; JOLIOT und JOLIOT, 1973)

Chloroplasten höherer Pflanzen und Algen erhalten zwei Cytochrome des b-Typs, die durch α -Banden bei 563 nm (Cyt b_6) und bei 559 nm (Cyt b_{559}) im reduzierten Zustand charakterisiert sind. Cyt b_{559} ist nach

Untersuchungen an Partikelfractionen mit PS II assoziiert; Cyt b_6 hingegen mit PS I (BOARDMAN und ANDERSON, 1967). Inzwischen unterscheidet man, seit der Entdeckung von Cyt b_{559} durch LUNDEGARDH (1962), zwischen zwei Komponenten. Man findet eine HP (High Potential)-Form mit einem Redox-Potential von $E'_0 = 350$ mV bei pH 7 (BENDALL, 1968; BOARDMAN et al., 1971; KNAFF und ARNON, 1971) und eine LP (Low Potential)-Form mit einem Redox-Potential von $E'_0 = +58$ bis $+80$ mV (CRAMER und BÖHME, 1972; KE et al., 1972).

Die Einordnung beider Cytochromformen in die Elektronentransportkette bzw. in einen zyklischen Elektronentransport um PS II ist durch in vivo Experimente nicht eindeutig gelungen.

Cyt b_{559} LP wird von PS I oxidiert. Aufgrund von Hemmstoffversuchen schlagen BÖHME und CRAMER (1971) die direkte Beteiligung der LP-Form am nicht-zyklischen Elektronentransport vor: Cyt b_{559} sollte danach zwischen dem primären Akzeptor von PS II und dem Plastochinonpool lokalisiert sein (BÖHME und CRAMER, 1971; KE et al., 1972; BISHOP, 1973). Die DCMU-Hemmbarkeit der Cyt b_{559} LP-Reduktion wird nicht einheitlich beurteilt (BÖHME und CRAMER, 1971; KE et al., 1972).

Cyt b_{559} LP kann, wie Ergrünungsversuche zeigen, in die Form mit höherem Redox-Potential überführt werden (PLESNICAR und BENDALL, 1973).

In etiolierten Gerstenkeimlingen ist Cyt b_{559} LP, Cyt f und Cyt b_6 vorhanden, nicht aber Cyt b_{559} HP, das im Verlaufe des Ergrünungsprozesses synthetisiert wird (HENNINGSEN und BOARDMAN, 1973). Da die Sauerstoffentwicklung zeitlich früher meßbar ist, schließen die Autoren, daß das Erscheinen von Cyt b_{559} HP nicht in einem funktionellen Zusammenhang mit dem O_2 -entwickelnden System steht. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von WADA und ARNON (1971) sowie COX und BENDALL (1972).

Interessanterweise vermögen Detergentien- wie Triton, Tris- Behandlung, etc., die die Sauerstoffentwicklung beeinflussen, Cyt b_{559} HP in Cyt b_{559} LP umzuwandeln (BENDALL und SOFROVA, 1971; KE et al., 1972).

Das Redox- Potential von Cyt b_{559} ist neben den oben genannten Einflüssen auch vom Phosphorylierungsvermögen der Chloroplasten abhängig. In gekoppelten Chloroplasten findet man vermehrt die HP-Form: in entkoppelten liegt dagegen die LP-Form in erhöhtem Maße vor (CRAMER et al., 1972).

Cyt b_{559} HP wird bei einer Temperatur von -196°C vom PS II oxidiert (VERMEGLIO und MATHIS, 1973; KNAFF und ARNON, 1969; FLOYD et al., 1971; CRAMER und BÖHME, 1972). Die Cyt b_{559} HP -Oxidation durch PS II ist abhängig von a) der Temperatur (BUTLER et al., 1973; CRAMER und BÖHME, 1972; VERMEGLIO und MATHIS, 1973; KNAFF und MALKIN, 1974); b) der Vorbelichtungszeit der Chloroplasten (VERMEGLIO und MATHIS, 1973) und c) der Detergentienbehandlung (KNAFF und ARNON, 1969).

Diesen Ergebnissen zur Folge scheint Cyt b_{559} die Rolle eines Elektronendonors für PS II von dem Zeitpunkt an zu übernehmen, wenn unphysiologische Bedingungen die Wasseroxidation verhindern. Demnach wäre Cyt b_{559} HP nicht in der nicht-zyklischen Elektronentransportkette zu lokalisieren, sondern in der Nähe des Reaktionszentrums von Photosystem II anzuordnen (HILLER et al., 1971).

Die Hemmwirkung von DCMU auf die Photooxidation von Cyt b_{559} HP durch PS II ist temperaturabhängig. So ist ein Hemmeffekt bei $+20^{\circ}\text{C}$ vorhanden (KNAFF und ARNON, 1969); hingegen ist bei -196°C keine Hemmung nachzuweisen (BENDALL und SOFROVA, 1971).

Die Cyt b_{559} HP - Reaktionen lassen auf einen Kreislauf um PS II schließen, können jedoch in in vivo -Experimenten nicht nachgewiesen werden, da die Reduktion des Reaktionszentrums von PS II durch den natürlichen Reaktionspartner offenbar schneller verläuft als die

Cyt b_{559} HP -Oxidation.

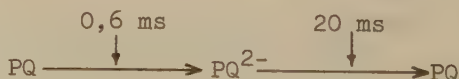
In der Photosynthese der Höheren Pflanzen und der Grünalgen sind nach dem Hill-Bendall-Schema die beiden photochemischen Lichtreaktionen über die Elektronentransportkette miteinander verbunden. Hinter dem Primärakzeptor Q, der weitgehendst durch das "Quenchverhalten" charakterisiert ist, ist ein Pool lokalisiert, der in einer 10 - 20 mal größeren Konzentration als Q vorliegt (AMESZ, 1973). Dieser Pool ist größtenteils mit Plastochinon A identisch (STIEHL und WITT, 1968: WITT, 1971).

Erstmals konnte BISHOP (1959) aufgrund von Extraktions- und Rekonstituierungsversuchen nachweisen, daß Plastochinon für den Elektronentransfer notwendig ist. Pro Elektronentransportkette werden 5-7 PQ-Moleküle - entsprechend 14 Elektronenäquivalenten - kalkuliert (CRANE et al., 1966; WITT, 1971; AMESZ, 1973).

Aufgrund neuerer Ergebnisse diskutiert man die Möglichkeit, daß zwei oder mehr PS II- Reaktionszentren Elektronen an den PQ- Pool abgeben (DUYSENS, 1970; WITT, 1971; MALKIN und MICHAELI, 1971). Demzufolge würden mehrere Elektronentransportketten durch den PQ-Pool miteinander verbunden werden.

Absorptionsänderungen von Plastochinon kann man bei 260 nm spektralphotometrisch verfolgen. Kinetische Messungen zeigen die Reduktion durch Photosystem II-Licht und die Oxidation nach PS I- Anregung (STIEHL und WITT, 1969; AMESZ et al., 1972).

Nach den Kurvenanalysen der Absorptionsänderungen beträgt die Halbwertszeit der Reduktion annähernd 0,6 ms und die der Reoxidation 20 ms.



Die Reoxidation von Plastohydrochinon ist die langsamste Reaktion in der Elektronentransportkette und

folglich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Der Mechanismus der PQ-Reaktion wird von WITT (1971) ausführlich diskutiert.

Die Plastochinonreaktion in der Elektronentransportkette spielt eine hervorragende Rolle im Entwicklungszyklus einzelliger Grünalgen. Die PS II- Aktivität von Scenedesmus, Chlorella und Chlamydomonas weist deutliche Schwankungen während des Zyklus auf (SENGER und BISHOP, 1969; SENGGER, 1970 b). Der Regelmechanismus, der zur Veränderung der Photosynthesekapazität führt, wird auf der reduzierenden Seite von PS II vermutet. Die Schwankungen der Photosyntheseleistung von Scenedesmus und Chlamydomonas werden, aufgrund von DBMIB- Hemmstoffversuchen, in der Veränderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes des Elektronentransportes -Reoxidation von PQH_2 - gesehen (FRICKEL-FAULSTICH, 1974; SENGGER und FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

Die Photosystem II - Reaktion, gemessen als Hillreaktion, offenbart im Vergleich von SW- und ST-Pflanzen deutliche Unterschiede in der lichtgesättigten Rate der Reduzierung des Hillakzeptors.

Die Rate der DCPIP-Reduktion ist in SW-Kulturen von Atriplex patula gegenüber den ST-Kulturen nahezu viermal so gering (BJÖRKMAN et al., 1972; BOARDMAN et al., 1974). Nach WILD et al. (1973) ist die PS II- Reaktion mit DPC als Elektronendonator und DCPIP als e-Akzeptor in ST-Sinapis alba- Pflanzen 3-4 mal so groß wie in SW-Pflanzen. Gar eine 15- fache Steigerung der DCPIP- Reduktionsrate von ST- Chloroplasten im Vergleich zu SW- Chloroplasten finden OGAWA und SHIBATA (1973), wenn man Weizenkeimlinge unter verschiedenen Lichtintensitäten anzieht.

Die Konzentrationen von Q, dem primären Elektronenakzeptor des Reaktionszentrums von PS II, sind pro Chlorophyll in SW- und ST- Atriplex patula annähernd gleich (BJÖRKMAN et al., 1972).

Der Plastochinonpool verändert sich unter Starklichtanzucht. Die Poolgröße von PQ erhöht sich in ST-Chloroplasten von Atriplex um das 3,5-fache im Vergleich zu SW-Chloroplasten (BJÖRKMAN et al., 1972). Von GRAHL und WILD (1972) wurde in Sinapis alba eine 2,5-fache Steigerung an Plastochinon in ST-Kulturen bestimmt. Im gleichen Zeitraum nahm Plastochinon und α -Tocopherol um das 5-6-fache in den ST-Pflanzen zu.

Gesteigerte Plastohydrochinonkonzentrationen wurden auch von FRICKEL-FAULSTICH (1974) zur 8. Stunde in Synchronkulturen in Scenedesmus gefunden.

Aufgrund der Zunahme der Lipochinone kann man nicht unbedingt auf eine funktionelle Änderung im Elektronentransport schließen, da neben der aktiven Form als Intermediat in der Elektronentransportkette, Plastochinon inaktiviert in Plastoglobuli gelagert wird (LICHTENTHALER, 1972).

In der Gruppe der b-Cytochrome weisen ST-Pflanzen einen 1,5 - 2,8-fach größeren Wert auf als SW-Pflanzen (BJÖRKMAN et al., 1972; WILD et al., 1973; BOARDMAN et al., 1974).

Faßt man die Ergebnisse der photochemischen Reaktionen um PS II nach Anzucht der Pflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen zusammen, so treten Unterschiede vor allem auf der reduzierenden Seite von PS II auf; bzw. wurden Untersuchungen nur auf der reduzierenden Seite durchgeführt.

1.4.2. Reaktionen um PS I:

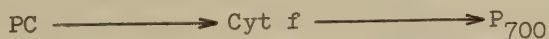
Die Intermediate der Elektronentransportkette, von PS II reduziert, werden von PS I oxidiert. Die Elektronen fließen dem Reaktionszentrum von PS I zu, werden von P_{700} durch eine weitere Lichtreaktion auf ein negativeres Niveau angehoben und auf einen unbekannten Akzeptor X übertragen. Das Redox-Potential des Akzeptors ist von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig und bewegt sich zwischen $E'_0 = -450$ bis -600 mV.

Die Natur des primären Elektronenakzeptors X ist unbekannt. Nach neueren spektralphotometrischen Befunden stimmt eine Absorptionsänderung bei 430 nm mit der P_{700} -Oxidation im kinetischen Ablauf überein. HIYAMA und KE (1971) vermuten in P_{430} den primären Elektronenakzeptor von PS I. Die Identifizierung des molekularen Aufbaues des Akzeptors ist bisher nicht eindeutig gelungen. Tieftemperatur-EPR-Signale lassen auf ein "gebundenes" Ferredoxin schließen (MALKIN und BEARDEN, 1973); dies wurde allerdings kürzlich wieder in Frage gestellt (MC INTOSH et al., 1974).

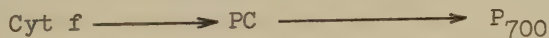
$NADP^+$ wird von Ferredoxin reduziert. Diese Reaktion wird von einem Enzym, der Ferredoxin-NADP-Oxido-Reduktase, katalysiert.

Die Fraktionierung von Spinatchloroplasten mit Digitonin durch BOARDMAN und ANDERSON (1967) zeigte, daß Cyt f und Cyt b_{563} mit Photosystem I verbunden sind. Cyt f wird durch PS I-Licht oxidiert und durch PS II-Licht reduziert (DUYSENS und AMESZ, 1962; BOARDMAN und ANDERSON, 1967). Diese Ergebnisse und das Redox-Potential weisen Cyt f eine funktionelle Bedeutung in der Elektronentransportkette zu.

Die Frage, ob Cyt f direkt mit P_{700} als Redox-Partner interagiert, ist Gegenstand zahlreicher Versuche. Es werden mehrere Hypothesen der Intermediatenfolge diskutiert.



(CHANCE et al., 1967; FORK und URBACH, 1965; LARKUM und BONNER, 1972).



(GORMAN und LEVINE, 1965; AVRON und SHNEYOUR, 1971; KATOH, 1972; KIMIMURA und KATOH, 1972; IZAWA et al., 1973; WOOD und BENDALL, 1975).

Nach Ansicht einiger Forscher ist ein paralleler Elek-

tronenfluß über Cyt f und PC zum Reaktionszentrum von PS I nicht auszuschließen.



(HIND und OLSON, 1966; WITT, 1971; HAEHNEL, 1973, 1974).

Nach einem Modell von KNAFF und ARNON (1971) existieren drei Photosysteme. Cyt f wird demzufolge mit einem isoliert arbeitenden PS I assoziiert. Plastocyanin soll von einer zweiten PS II- Reaktion (PS IIa) oxidiert werden. KNAFF (1973) berichtet später über Untersuchungen an "beschallten" Chloroplastenpartikeln, nach denen PC die Reduktion von Cyt f ermöglicht. EPR-Signale von oxidiertem, gebundenen Plastocyanin in Partikeln stützen die These, daß PC vor Cyt f in der nicht-zyklischen Elektronentransportkette lokalisiert ist und auf der reduzierenden Seite eine Energiekonservierungsstelle vorhanden ist (MALKIN und BEARDEN, 1973).

Die Ergebnisse der vergangenen Jahre, die von den verschiedenen Arbeitsgruppen erzielt worden sind, lassen eine grundlegende Bestimmung der Reihenfolge der Intermediate vor P₇₀₀ nicht zu.

Möglicherweise sind die sich widersprechenden Vorschläge der Anordnung von PC und Cyt f auf der oxidierenden Seite von PS I auf unterschiedliche Chloroplastenpräparationen und Partikelherstellungen zurückzuführen. Offenbar benötigen PS I -Partikel, die auf mechanischem Wege hergestellt worden sind, für photochemische Reaktionen kein Plastocyanin. Andererseits sind in Detergenz- PS I -Partikeln PC- Zugaben für die NADP⁺ - Reduktion notwendig (MURATA und FORK, 1971; FORK und JAKOBI, 1971).

Mit Triton behandelte Partikel verlieren die Fähigkeit, eine schnelle Cyt f- Oxidation bei 420 nm durchzuführen. Die Zugabe von PC kann die Wiederherstellung der schnellen Reaktion nicht bewirken (FORK, 1971).

Weitere Ausführungen über Aufbau und Funktion von Plastocyanin sind den Übersichtsartikeln (BISHOP, 1971; TREBST, 1974) oder speziellen Arbeitspapieren (KATOH, et al., 1971; KATOH, 1972; IZAWA et al., 1973) zu entnehmen.

Cyt b_{563} , mit einer reduzierten λ -Bande bei 563 nm, wurde zuerst von HILL (1954) beobachtet und als Cyt b_6 in die Photosyntheseforschung eingeführt. Cyt b_{563} wird von PS I reduziert und ist mit einer gleichlaufenden Oxidation von Cyt f verbunden (FORK und MURATA, 1971).

Die Literaturdaten machen einen zyklischen Elektronentransportweg um PSI wahrscheinlich (HIND und OLSON, 1966; BOARDMAN und ANDERSON, 1967; PARK und SANE, 1971; LEVINE und REIMANN, 1969). Durch Hemmstoffversuche mit DBMIB konnte gezeigt werden, daß der zyklische Elektronenfluß über Cyt b_{563} in den Plastochinonpool einmündet und eine Energiekonservierungsstelle zwischen PQ und Cyt f besitzt (TREBST und ECK, 1961; BÖHME und CRAMER, 1972). Aktionsspektren der Cyt b_{563} -Reduktion machen einerseits die Funktion im zyklischen Elektronenweg um PS I deutlich; andererseits kann eine DCMU-empfindliche Verbindung zu PS II nicht ausgeschlossen werden (BÖHME und CRAMER, 1972).

Anderen Vorstellungen zur Folge ist der direkte Elektronenübergang von Cyt b_{563} auf Cyt f (HIYAMA et al., 1969) oder auf PC (HIND und OLSON, 1966) nicht ausgeschlossen.

Das Redox-Potential von Cyt b_{563} beträgt $E'_0 = -180$ mV (FAN und CRAMER, 1970). In etiolierten Gerstenkeimlingen wurde E'_0 mit 0,0 mV bestimmt (HILL und BENDALL, 1967).

DAD vermag Cyt b_{563} teilweise zu reduzieren (BÖHME und CRAMER, 1972). Da das Redox-Potential von DAD bei +230 mV liegt, ist die Reduktion von Cyt b_{563} entweder mit einem energieverbrauchenden Schritt gekoppelt, oder das DAD-Potential ist in Verbindung mit der Chloroplastenmembran negativer als der gemessene Wert in wässriger Lösung.

Die Angaben über den Anteil des Reaktionszentrums von PS I, P_{700} , im Vergleich von SW- und ST- Pflanzen bezogen auf Chlorophyll, sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Pflanze	Chl/ P_{700}	Differenzspektrum	Autoren
<i>Sinapis alba</i>	SW: 209 ST: 210	chemisch induz.	WILD et al., 1973
<i>Cordyline rubra</i>	SW: 830 460	photochem. induz. chem. induz.	BJÖRKMAN et al., 1972
<i>Atriplex patula</i>	SW: 582 354	photochem. induz. chem. induz.	BOARDMAN et al., 1972
<i>Atriplex patula</i>	ST: 491	photochem. induz.	BOARDMAN et al., 1972
<i>Anacystis</i>	SW: 140 ST: 260	photochem. induz.	ÖQUIST, 1974

Tab. 1: Vergleich einiger Chl/ P_{700} - Werte von Stark- und Schwachlichtpflanzen.

Weizenkeimlinge, die unter Schwachlichtbedingungen angezogen wurden, bilden bevorzugt Photosystem I aus.

Starklichtanzucht wirkt sich verstärkt auf die Entwicklung von Photosystem II aus (OGAWA und SHIBATA, 1973).

In diesen Versuchen war die PS I- Reaktion in SW- Chloroplasten etwa doppelt so groß wie in ST- Chloroplasten.

In Digitonin- PS I- Partikeln von *Sinapis alba* erreicht die $NADP^{+}$ - Reduktion einen 1,5 mal so großen Wert wie in D-144 SW- Partikeln (WILD et al., 1973).

Der Quotient: ST/SW der $DCPIPH_2$ - $NADP^{+}$ - Reduktion beträgt in *Atriplex patula* in der gekoppelten Reaktion 5,7; für die TMPD-MV- Reaktion: 2,3 (BOARDMAN et al., 1972).

Die Angaben in der Literatur geben übereinstimmend einen vergleichsweise höheren Cytochromgehalt pro Chlorophyll für ST- Pflanzen an. Das Chl/Cyt- Verhältnis ist danach in den ST- Pflanzen um das 1,5 - 2,9-fache ge-

ringer, als in SW- Pflanzen (BOARDMAN et al., 1972; WILD et al., 1973). Diese Zahlen beziehen sich sowohl auf Cyt f, als auch auf Cyt b_{563} und Cyt b_{559} .

1.5. Elektronenfluß und Photophosphorylierung

Die Elektronen, die bei der Wasserspaltung frei werden, werden über das Redoxsystem zum natürlichen Akzeptor NADP^+ transportiert. Nach neueren Vorstellungen verläuft der Transport quer durch die Membran. Die Donorseiten von PS II und PS I liegen auf der Innenseite der Thylakoidmembran, während die Akzeptorseiten auf der Matrixseite lokalisiert sind (SCHLIEPHAKE et al., 1968; TREBST und HAUSKA, 1974; JUNGE, 1974; IZAWA et al., 1973).

Beides, Wasserspaltung und PQ-Oxidation, sind als native Energiekonservierungsstellen im Sinne der Mitchell-Hypothese anzusehen (TREBST und HAUSKA, 1974). Detailliert wird das Problem des gerichteten Elektronentransportes in einem Übersichtsartikel von TREBST (1974) behandelt.

Neben der nicht-zyklischen Photophosphorylierung, die auf dem Elektronenfluß von $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NADP}^+$ beruht, werden die zyklische PS I und die pseudozyklische Photophosphorylierung diskutiert.

In SW-Pflanzen ist die P_{700} -Konzentration bezogen auf Cyt f und Ferredoxin etwa 3 mal so groß wie in ST-Pflanzen (BOARDMAN et al., 1972; WILD et al., 1973). Daraus wird gefolgert, daß der überwiegende Teil des P_{700} an einen zyklischen Elektronenfluß um PS I gebunden sei (WILD et al., 1973). Andererseits wird von BENDALL und GOVINDJEE (1973) in Oligomycin-behandelten ST-Chlorella-Zellen ein 40 - 50%iger Anteil der zyklischen Photophosphorylierung an der Gesamtrate der gebildeten Energieäquivalente gemessen. In normal kultivierten Chlorella-Zellen beträgt der Anteil der zyklischen Phosphorylierung 10 - 30% der Gesamtrate. An der Thylakoidmembran wird ein elektrochemisches Feld

aufgebaut, dessen Feldstärke Einfluß auf Photophosphorylierung, Fluoreszenz und Konformationsänderungen hat.

Die lichtinduzierte Chloroplastenschrumpfung, die bei etwa 540 nm aufgrund von Lichtstreuungseffekten an intakten Chloroplasten und einzelligen Algen gemessen wird, wird als Indikator eines mit Phosphorylierungsvorgängen gekoppelten Elektronentransportes interpretiert (HEBER, 1969). Weiterhin korrelieren die Konformations- und Konfigurationsänderungen mit der Ionenumgebung und dem osmotischen Zustand der Chloroplasten (MURAKAMI und PARKER, 1970).

HEBER (1969) weist auf die Intensitätsabhängigkeit der Chloroplastenschrumpfung hin, die die Folge der unterschiedlichen Anregungscharakteristiken der Photosysteme ist. Nach seiner Vorstellung ist der Oxidations - Reduktionszustand der Intermediate der Elektronentransportkette und das Reduzierungsvermögen von PS II als Regulativ eines zyklischen Elektronenweges um PS I in vivo denkbar.

Neuerliche Untersuchungen von SIEFERMANN und YAMAMOTO (1975) geben Hinweise darauf, daß Violaxanthin - bzw. die De-Epoxidierung - als Indikator für Konformationsänderungen anzusehen ist. Nach diesen Ergebnissen ist Violaxanthin nicht direkt mit dem Elektronentransport von PS II nach PS I verknüpft; die Violaxanthinanwesenheit scheint aber mit einem oder mehreren Redox- Partnern und deren reduziertem Zustand im Verhältnis zu stehen.

Untersuchungen über den Xanthophyll-Zyklus Violaxanthin ---- Zeaxanthin in Abhängigkeit von der Beleuchtung werden eingehend von HAGER (1967) diskutiert.

Im lichtinduzierten Differenzspektrum findet man in photosynthetisch aktiven Organismen eine maximale Absorptionszunahme im Bereich von 515 - 520 nm. Die Absorptionszunahme wird sowohl den Pigmentsystemen der Photoreaktion II als auch PS I zugeschrieben. Die Annahme basiert einerseits auf dem teilweise hemmenden

Effekt von DCMU und andererseits auf Aktionsspektren. (FORK und URBACH, 1966; FORK et al., 1966).

Kinetischen Messungen an Mutanten zufolge postulierten PRATT und BISHOP (1968), daß beide Phasen in vivo mit PS I direkt korrelieren und PS II nur indirekt wirkt. Die zweite, langsame Phase der Absorptionsänderung wird vom Reduktionszustand der Intermediate der Elektronentransportkette bestimmt (LARKUM und BONNER, 1972).

Verschiedene Komponente des Photosyntheseapparates wurden in den letzten Jahren mit dem 520 nm-change in Zusammenhang gebracht; z.B. Plastochinon, Plastocyanin, Carotinoide, Chlorophyll b und Chlorophyll a (FORK et al., 1966; SCHLIEPHAKE et al., 1968; AMESZ und DE GROOTH, 1975).

Tieftemperaturuntersuchungen bestätigen die Teilnahme beider photochemischer Reaktionen. Die PS II- bedingte Änderung deutet auf zwei verschiedene Reaktionen im Reaktionszentrum von PS II hin. Neben der Reduktion von Plastochinon dürften die Photooxidation von Cyt b_{559} , C-550 als Elektronenakzeptor - bzw. als Indikator für den Zustand des Elektronenakzeptors und der Zustand der $S_2 - S_3$ - Zustände beeinflussend wirken (MATHIS und VERMEGLIO, 1974; VERMEGLIO und MATHIS, 1974; AMESZ und DE GROOTH, 1975). Im Sinne einer Ladungstrennung der Photosysteme und eines elektrochemischen Feldes an der Thylakoidmembran wird die 515 nm-Absorptionsänderung von RENGGER (1974) diskutiert.

1.6. Künstliche Elektronendonatoren und -akzeptoren sowie Hemmstoffe der Photosynthese

Schon frühzeitig wurden künstliche Elektronenakzeptoren in die Photosyntheseforschung eingeführt. Seit der Chloroplastenfragmentierung war es notwendig geworden, die einzelnen Teilreaktionen der Photosynthese mit künstlichen Elektronendonatoren und -akzeptoren zu untersuchen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Donatoren

und Akzeptoren. Zum einen Donatoren, die Elektronen an PS II oder an PS I abgeben und entsprechend Akzeptoren, die nach PS II oder nach PS I Elektronen aufnehmen. Eng verbunden mit der Messung von Teilreaktionen ist das Abblocken des einen oder anderen Photosystems.

Beides, Angriffspunkt der verschiedenen Hemmstoffe und vermutete Positionen der Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren in der Elektronentransportkette, werden anhand von Fig. 3 näher besprochen.

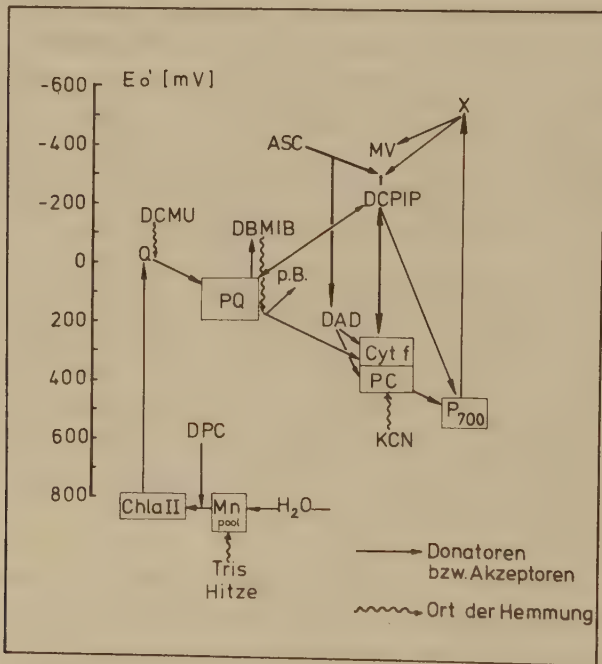


Fig. 3: Potential-Schema des photosynthetischen Elektronentransportes mit den vermutlichen Angriffsstellen der hier verwendeten Hemmstoffe, Elektronendonatoren und -akzeptoren

Die Reaktionen um PS II können durch Erwärmen bei 50°C oder 0,8 M Trisbehandlung auf der oxidierenden Seite gehemmt werden (YAMASHITA und BUTLER, 1968). Die Hemmstelle liegt zwischen der Wasseroxidation und dem Reaktionszentrum von PS II. Allgemein wird vermutet, daß durch die verschiedenen Behandlungen Mn- Ionen von ihrer funktionellen Seite abgetrennt werden und so das wasserspaltende System inaktivieren (CHENIAE und MARTIN, 1973).

DCMU wurde als weiterer Hemmstoff von PS II erkannt (BISHOP, 1958). Als mögliche Hemmstellen wurden seitdem mehrere Angriffspunkte genannt. Als häufigste Blockierungsstelle wird für DCMU die Unterbrechung des Elektronenflusses zwischen dem primären Akzeptor Q und dem Plastochinonpool angenommen (DUYSENS und SWEERS, 1963; YAMASHITA und BUTLER, 1968; WITT, 1971; DÖRING, 1975).

Mit 2,5 Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon (DBMIB) wurde ein weiterer Inhibitor des Elektronenflusses zwischen PS II und PS I von der Bochumer Arbeitsgruppe um TREBST in die Photosyntheseforschung eingeführt. (TREBST et al., 1970). Die kompetitive Hemmung von DBMIB erfolgt auf der reduzierenden Seite von Plastochinon. Man vermutet, daß sowohl PQH₂ als auch DBMIB um die Reoxidation konkurrieren (TREBST et al., 1970; BÖHME et al., 1971; IZAWA et al., 1973). Die wirksame Konzentration für die Hemmwirkung liegt bei etwa 10⁻⁶ M (TREBST, 1974).

Diphenylcarbazid (DPC) wurde von VERNON und SHAW (1969) als Elektronendonator für PS II nach der Inaktivierung der Wasserspaltung erstmals eingesetzt. Die Photoreduktion von DCPIP mit DPC als e-Donor weist eine starke pH- Abhängigkeit sowie Beeinflussung durch die Ionenumgebung auf. Da die DCPIP- Reduktion mit DPC in geringem Maße über PS I verläuft, wird die Gesamtreaktion um den Wert, der nicht DCMU- hemmbar ist, korrigiert. Die DPC --> DCPIP- Reaktion ist in PS II- Partikeln effektiver als an intakten Thylakoidsystemen (VERNON und SHAW, 1969).

Ein seit langem bekannter Hillakzeptor ist p-Benzochinon,

das ausschließlich zwischen PS II und PS I Elektronen abgreift (SENGER, 1970 b).

2,6 - Dichlorophenolindophenol kann sowohl hinter PS II als auch nach PS I reduziert werden (SCHMIDT - MENDE und WITT, 1968; LIEN und BANNISTER, 1971; KE, 1973). KOK et al. (1970) zeigen, daß die DCPIP- Reduktion aus zwei Phasen, einer schnellen, die man PS I zuordnet und einer langsamen, die PS II- Aktivität nachweist, besteht.

An PS I- Partikeln oder nach der Hemmung des Elektronenflusses von PS II nach PS I mit DCMU, kann DCPIPH₂ als Elektronendonator für eine PS I- Reaktion verwendet werden. Die Reduktion von DCPIP erfolgt durch Ascorbat, das selbst keine Elektronen an das photochemische System abzugeben vermag. Ähnlich wie DCPIPH₂ kann 2,3,5,6 - Tetramethyl -p- phenyldiamin (Diaminodurool, DAD) in reduzierter Form Elektronen für eine PS I- Teilreaktion liefern.

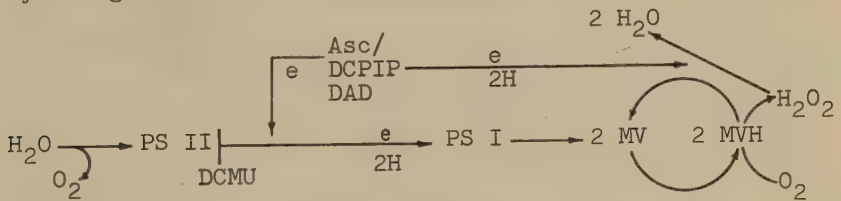
Beiden Donatoren ist gemeinsam, daß die Elektronenabgabe mit einem Photophosphorylierungsvorgang verbunden ist (TREBST, 1974; TREBST und HAUSKA, 1974; STROTMANN und v. GÖSSELN, 1972).

Das Redox- Potential von DCPIPH₂/DCPIP mit $E'_0 = -220$ mV ermöglicht es, PS I zu reduzieren. Der Indophenol- farbstoff würde dann einen zyklischen Elektronentransport um PS I - möglicherweise ohne Rückkehr über natürliche Redox-Partner - katalysieren (NEUMANN et al. 1972; STROTMANN und v. GÖSSELN, 1972).

Ähnlich wie DCPIPH₂ vermag das künstliche Elektronendonorpaar Asc/DAD Elektronen in PS I einzuschleusen (IZAWA et al., 1966). Vielfach wird Plastocyanin als natürliche Redoxkomponente für den DAD- katalysierten Elektroneneinfluß angesehen (TREBST und PISTORIUS, 1965; TREBST und HAUSKA, 1974). Eingehende Untersuchungen über die Plastocyaninabhängigkeit der Asc/DAD --> MV- Reaktion werden von GROMET - ELHANAN und REDLICH (1972) interpretiert.

Als ein wirksamer Elektronenakzeptor für PS I hat sich Methylviologen (MV) mit einem Redox- Potential von $E'_0 = -445 \text{ mV}$ erwiesen. Da das Semichinon des Methylviologens autooxidabel ist, kann der photosynthetische Elektronenfluß als Sauerstoffaufnahme des Reaktionssystems gemessen werden (IZAWA et al., 1966).

Bei der Reaktion entsteht H_2O_2 , das mit Hilfe einer endogenen Katalase und Elektronen von dem Donorsystem zu H_2O reduziert wird. Die Reaktion verläuft im linearen System geschrieben, folgendermaßen:



Einen ausführlichen Überblick künstlicher Donor- und Akzeptorsysteme um PS II und PS I gibt TREBST (1974) in einem Übersichtsartikel. Weiterhin sei auf die umfassende Studie der Teilreaktionen der Photosynthese des Workshops 1972 in Göttingen verwiesen (JACOBI, 1972).

2. ZIELSETZUNG

In den vergangenen Jahren wurde vielfach über die Photosynthesekapazität von Licht- und Schattenpflanzen berichtet. Einerseits kann die Differenzierung genetisch fixiert sein (BJÖRKMAN und HOLMGREN; 1963, 1966); d.h. die Anpassungsfähigkeit an einen zweiten Standort mit verändertem Lichteinfluß ist nur gering.

Andererseits liegen Untersuchungen an Höheren Pflanzen vor, die eine Vielzahl von Anpassungserscheinungen an unterschiedliche Lichtbedingungen nennen.

Schattenpflanzen bzw. Pflanzen unter Schwachlichtanzucht (SW- Typ) nutzen, wie allgemein bekannt ist, niedere Lichtintensitäten besser als Sonnenlichtpflanzen unter Starklichtanzucht (ST- Typ).

Höhere Pflanzen vom SW- Typ erreichen eher den Kompensationspunkt des O_2 -Gaswechsels als ST- Pflanzen. Die Lichtsättigungskurve von SW- Pflanzen biegt im Vergleich zur Lichtsättigungskurve der ST- Pflanzen frühzeitig in den Sättigungsbereich ein. ST- Pflanzen verfügen bei hohen Beleuchtungsstärken über eine hohe Photosynthesekapazität, während die Effektivität des Systems bei geringen Lichtintensitäten schwach ausgebildet ist.

Anpassungserscheinungen an den Umweltfaktor "Licht" sind in überwiegendem Maße an Höheren Pflanzen untersucht worden. Es war daher interessant zu wissen, ob und in welchem Umfang Veränderungen des Photosynthesapparates an Grünalgen auftreten. Da solche Untersuchungen an möglichst genau definiertem Material durchgeführt werden sollten, wurden für die hier dargestellten Versuche homokontinuierliche Kulturen der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus eingesetzt.

Untersuchungen über Stark- und Schwachlichteinfluß auf Algen wurden größtenteils an Chlorella durchgeführt. Veränderungen treten im Chlorophyll a/b- Verhältnis in Chlorella vanniellii auf (REGER und KRAUSS,

1970). MYERS und GRAHAM (1971) messen in Chlorella pyrenoidosa Unterschiede in der Größe der Photosyntheseeinheit; an ST- Chlorella vulgaris (GOVINDJEE et al., 1967) konnten im Gegensatz zu Untersuchungen des Effektes an ST- Anacystis nidulans (ÖQUIST, 1974) keine Steigerung der Sauerstoffentwicklung festgestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob, und wenn ja, in welchem Umfang Unterschiede in der Photosynthesekapazität von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus auftreten.

Dazu war es notwendig, homokontinuierliche Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus zu charakterisieren, an diesen Kulturen Teilreaktionen der Photosynthese zu messen und den Elektronentransport zwischen Photosystem II und Photosystem I näher zu untersuchen.

Weiterhin sollte versucht werden, eine Aussage über die drei sich bedingenden Faktoren: Photosyntheseleistung, Größe der photosynthetischen Einheit und Reaktionsgeschwindigkeit des Elektronentransportes zu machen.

Außerdem sollten die durch unterschiedlichen Lichteinfluß auftretenden Reaktionsmechanismen Höherer Pflanzen und homokontinuierliche Dauerlichtkulturen von Scenedesmus miteinander verglichen werden.

3. METHODIK

3.1. Objekt und Anzucht

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Scenedesmus obliquus, Stamm D₃ (Gaffron) durchgeführt. Die einzelnen Grünalgen wurden von Schrägagrarkulturen unter sterilen Bedingungen in autoklavierte Nährlösung übertragen.

Das Nährmedium setzte sich nach Angaben von KESSLER et al. (1957) und BISHOP und SENGGER (1971) zusammen.

KNO ₃			8	x 10 ⁻³	M
NaCl			8	x 10 ⁻³	M
Na ₂ HPO ₄	x	2 H ₂ O	1	x 10 ⁻³	M
NaH ₂ PO ₄	x	2 H ₂ O	3	x 10 ⁻³	M
CaCl ₂	x	2 H ₂ O	1	x 10 ⁻⁴	M
MgSO ₄	x	7 H ₂ O	1	x 10 ⁻³	M
Fe ₂ (SO ₄) ₃	x	7 H ₂ O	7,5	x 10 ⁻⁶	M
Na-citrat	x	2 H ₂ O	5,5	x 10 ⁻⁴	M

Zusätzlich wurde zu je einem l Nährlösung 1 ml der Spurenelementlösung A₅ nach KRATZ und MYERS (1955) hinzugefügt. Die Spurenelementlösung A₅ hatte folgende Zusammensetzung:

H ₃ BO ₃			4,5	x 10 ⁻²	M
MnCl ₂	x	4 H ₂ O	8	x 10 ⁻³	M
ZnSO ₄	x	7 H ₂ O	7	x 10 ⁻⁴	M
MoO ₃			1	x 10 ⁻⁴	M
CuSO ₄	x	5 H ₂ O	3	x 10 ⁻⁴	M

Die Flüssigkeitskulturen befanden sich in Kulturröhren von 42 cm Länge und 3,7 cm Durchmesser und wurden von unten mit einem Gasgemisch von 3% CO₂ in Luft (ca. 20 l/Std) durchperlt (LORENZEN, 1959). Die Kulturröhren standen in einem Lichtthermostat (Kniese, Marburg).

Die Algensuspensionen wurden im Dauerlicht angezogen.

Die Lichtintensitäten betrugen an der Oberfläche der Kulturröhren in den Vorversuchen 5000 Lux, 10000 Lux, 15000 Lux, 22000 Lux, 28000 Lux. resp. 34000 Lux. In den Hauptversuchen betrugen sie 4000 Lux oder 28000 Lux. Als Lichtquellen dienten Leuchtstoffröhren des Typs Osram-L 40W/15-1 (Tageslicht) und Osram-L 40W/25-1 (Universal weiß). Die spektrale Strahldichte-Verteilung dieser Röhrenkombination ist bei SENGGER et al. (1972) angegeben. 9 Fluoreszenzlampen (5 Universal weiß; 4 Tageslicht) im Abstand von 12 cm erzeugten an der Oberfläche der Kulturröhren eine Intensität von 28000 Lux. 5 Leuchtstoffröhren (3 Universal weiß; 2 Tageslicht), die sich in einem Abstand von 15 cm von den Kulturröhren befanden und mit Graupapier abgeschwächt wurden, erzeugten eine Intensität von 4000 Lux. Die spektrale Strahldichte-Verteilung dieser Röhrenkombination ist bei SENGGER und WOLF (1964) angegeben.

Die Dichte der homokontinuierlichen Kultur wurde photometrisch kontrolliert und automatisch durch Verdünnung konstant gehalten (SENGGER et al., 1972).

In den Hauptversuchen wurde eine konstante Zellzahl von $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml in den Kulturröhren eingestellt. Die Temperatur betrug in den Voruntersuchungen 20°C, 25°C, 30°C resp. 35°C. Bei der Anzucht der Kulturen während der Hauptversuche wurde die optimale Temperatur von 30°C ausgewählt.

3.2. Bestimmung der Versuchsparameter

Zellzahl, PCV (packed cell volume) und Pigmentgehalte wurden nach den Angaben von SENGGER (1970a) bestimmt.

Die Zellzahl wurde mittels einer Zählkammer (Thoma neu) ermittelt.

Das Volumen dichtest gepackter Zellen (PCV) wurde in Hämatokritröhrchen (nach Hamburger) durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 1400 g in einer Tischzentrifuge (Heraeus Christ, Typ Labofuge II, Osterode) bestimmt.

Der Pigmentgehalt wurde nach mehrmaligem Extrahieren

der Zellen mit heißem Methanol gegen Methanol spektralphotometrisch in einem PMQ III (Zeiss) bei 665 nm; 650 nm und 452,5 nm gemessen und mit Hilfe der bei SENGGER (1970a) zitierten Formeln auf mg Chlorophyll bzw. Carotinoide/l umgerechnet.

3.3. Photosynthetische Sauerstoffmessungen:

Die Sauerstoffentwicklung der Photosynthese und Hillreaktion sowie die photosynthetisch bedingte Sauerstoffaufnahme von Methylviologen und die Sauerstoffaufnahme der Atmung wurden polarographisch in einem "Gilson Oxygraph" (Gilson Medical Electronic, Middleton, Wisconsin, Techmation, Düsseldorf) mit einer stationären Micro-Clark Elektrode (Typ YSI 5331, Yellow Springs Instruments Co) verfolgt. Die Polarisationsspannung betrug -0,8V. Der Polarisationsstrom ist der Sauerstoffkonzentration proportional. Die O_2 -Konzentrationsänderungen wurden in Abhängigkeit von der Zeit registriert (SENGGER, 1970a).

Die Clark-Elektrode, die in ihrer Empfindlichkeit im Bereich von 20 - 35°C linear von der Temperatur abhängig ist, wurde gegen luftgesättigtes Wasser geeicht. Dabei wurde zur Einstellung des Empfindlichkeitsbereiches bei 30°C ein Wert von 225 nmol O_2 /ml den Auswertungen zugrunde gelegt (LESSLER, 1972; EASTBROOK, 1967). Als Nullpunkt wurde der "zero count" gewählt. Ein Sedimentieren der Algensuspension, die sich während der Messung in einer temperierbaren Reaktionskammer befand, wurde durch einen Magnetrührer verhindert. Gleichzeitig wurde damit eine gleichmäßige Verteilung der gelösten Gase im Reaktionsraum erzielt. Bei den photosynthetischen Sauerstoffentwicklungen bzw. -aufnahmen wurden die Algen mit einem Projektor (Prado Universal) belichtet. Ein rotes Plexiglas im Strahlengang war nur für Wellenlängen oberhalb 620 nm durchlässig.

3.4. Herstellung photosynthetisch aktiver Partikel

Die Präparation photosynthetisch aktiver Partikel erfolgte nach MELL (1974), SENGER und MELL (1975). Die Methode des Aufbruchverfahrens stellt eine Modifikation des Aufschlußverfahrens von BERZBORN und BISHOP (1973) dar.

200 µl Algen der SW-Kulturen oder 250 µl der ST-Kulturen wurden abzentrifugiert und in 2 ml eiskaltem Aufbruchsmedium aufgenommen. Diese Suspension wurde in einem 6,7 ml Stahlbecher mit Glasperlen von einem Ø von 0,7 mm in einer Vibrogen - Zelmühle (Typ Vi 2, Bühler, Tübingen) bei +3°C fünf Minuten lang geschüttelt. Mit Hilfe einer Glasfritte (17 D₁ Schott, Mainz) wurde das Homogenat von den Glasperlen getrennt und mit einer Waschflüssigkeit nachgespült. Die ganzen Zellen, die sich in den gesammelten Filtraten befanden, wurden abzentrifugiert. Der Überstand, der keine ganzen Zellen enthielt, wurde vorsichtig aufgenommen und für die jeweiligen Reaktionen in Eis bei 0°C aufbewahrt. Von 1 ml des Überstandes wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt.

Infolge der unterschiedlichen Versuchsansätze verändern sich Aufbruchs- und Waschmedium. Sie werden bei den jeweiligen Reaktionen genannt werden. Alle Reaktionsmessungen erfolgten, da weitgehendst auf Saccharoselösungen verzichtet wurde, sofort im Anschluß an den Aufbruch.

3.5. Messungen zur Photosystem II- Reaktion

a) Hill-Reaktion mit p-Benzochinon

Die O₂- Entwicklung der Hill-Reaktion mit p-Benzochinon als Hill-Akzeptor wurde polarographisch gemessen. Ganze Zellen (20 µg Chlorophyll/ml) waren in Sörensenpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. Als Hillreagenz wurde p-Benzochinon in einer Endkonzentration von 3×10^{-3} M verwandt. Die Intensität des Anregungs-

lichtes betrug maximal $6,25 \times 10^5 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$.

b) Hill-Reaktion mit DCPIP

Die Messung der Hillreaktion mit DCPIP wurde in einem Aminco Chance DW 2- Spektralphotometer durchgeführt, die Probenküvette mit den sich darin befindenden Partikeln seitlich mit einem Projektor (Prado, Universal), in dessen Strahlengang sich ein Plexiglasfilter (durchlässig oberhalb 620 nm) befand, angeregt. Die Extinktionsabnahme, die die Reduktion des blauen Farbstoffes anzeigt, wurde bei 578 nm während der Belichtungszeit kontinuierlich gemessen. Zum Schutze des Photomultipliers vor dem Anregungslicht wurden zwischen Küvetten und dem Multiplier ein Interferenzlinienfilter (IL 578, Schott, Mainz) und ein Corningglasfilter (G. S. 4.96, Sovirel) angebracht.

Für den angewandten pH- Bereich in Verbindung mit dem Meßlicht und der Filterkombination wurde ein millimolarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 7,25 \text{ cm}^2 \text{ mM}^{-1}$ bestimmt und der Auswertung zugrunde gelegt.

Vergleichsmessungen zwischen dem Phosphatpuffer (0,05 M: pH 7,0) und dem Pufferansatz von MELL (1974) ergaben keine Unterschiede in der Reduktionsrate der DCPIP-Hillreaktion innerhalb von 3 Stunden. Im pH-Bereich von 6,5 - 7,0 wies die DCPIP- Reduktion keine Veränderung auf. Die Intensität des Anregungslichtes wurde von 0 bis maximal $2,5 \times 10^5 \text{ erg cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ variiert. Alle Messungen wurden sofort nach dem Aufbrechen der Zellen im Sörensenpuffer durchgeführt.

c) DCPIP-Reduktion mit DPC als Elektronendonator

Die Algen wurden vom Nährmedium abzentrifugiert und die Zellen in der oben beschriebenen Weise aufgebrochen. Ein Teil der Suspension wurde zur Messung der DCPIP-Hill-Reaktion als Kontrollwert verwendet; der andere Teil wurde in einem Wasserbad auf 48°C erhitzt. Der

hitzebehandelten Partikelsuspension wurde nach 10, 20 und 30 min Proben entnommen und die Inaktivierung des wasserspaltenden Systems anhand der H_2O ---- DCPIP Reduktion bestimmt.

Im Anschluß daran wurde Diphenylcarbazon (DPC) in einer Endkonzentration von 5×10^{-4} M beiden Küvetten zugegeben und die Reaktion photometrisch verfolgt. Abschließend wurde die PS II- Reaktion mit 10^{-6} M DCMU gehemmt und die Gesamtreaktion um den nicht hemmbaren Teil korrigiert.

61 mg DPC wurde in 5 ml absolutem Äthanol gelöst und anschließend um das 10-fache mit H_2O - dest. verdünnt. Die Konzentration dieser Lösung betrug 5×10^{-2} M, und es wurden 0,03 ml in die Reaktion eingesetzt. Die Äthanolkonzentration mußte so niedrig wie möglich gehalten werden, da Äthanol die DCPIP- Reduktion negativ beeinflusst.

Für jede Versuchsreihe wurde die Lösung frisch angesetzt.

3.6. Messungen zur Photosystem I - Reaktion

a) Photoreduktion

Die Messung der Photoreduktion von CO_2 mit H_2 als Donator als Teilreaktion von Photosystem I erfolgte in einem Allglasdifferentialmanometer (GAFFRON, 1940; BISHOP, 1966). Dazu wurden 3 ml Algen (20 µg Chlorophyll/ml) in 10 millimolaren Phosphatpuffer vom pH 7,0 suspendiert und 14 Stunden an ein Gasgemisch von 96% Wasserstoff und 4% CO_2 zur Aktivierung der Hydrogenase, die sich unter anaeroben Bedingungen bildet, adaptiert. Die Ansatzbirne des Reaktionsgefäßes war mit 0,5 ml 5×10^{-5} M DCMU gefüllt. Zu Beginn der Belichtung wurden dann DCMU und Reaktionsgemisch miteinander vereinigt, um Photosystem II auszuschalten und so eine Inaktivierung der Hydrogenase durch sich bildenden Sauerstoff zu vermeiden (vergl. SENGGER, 1970 b).

b) Messung der PS I - Aktivität der photo-synthetisch aktiven Partikel

Die PS I -Aktivität der Partikel wurde anhand der Sauerstoffaufnahme während der Photoreduktion von Methylviologen bestimmt (s. Kap 1.6.). Die Zellen waren in Phosphatpuffer (pH 6,5; 0,05 M) aufgebrochen und auf 30 µg Chlorophyll/ml eingestellt worden. Dieser Partikelsuspension wurden

Ascorbat	5×10^{-3} M
DCMU	2×10^{-6} M
Methylviologen	1×10^{-3} M
DCPIP	1×10^{-4} M
	(Endkonzentrationen)

oder DAD (10^{-5} M - 10^{-3} M) in den Reaktionsraum hinzugegeben. Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch während der Belichtung (Rotlicht oberhalb 620 nm) gemessen. Die Lichtintensität betrug $6,25 \times 10^5$ erg $\times$ $\text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ (IZAWA et al., 1966; STROTMANN und v. GÖSSELN, 1972; SENGER und FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

3.7. Pigmentanalyse

100 µl Algen der SW- und ST- Kulturen wurden vom Nährmedium abzentrifugiert und in siedendem Methanol mehrfach extrahiert, bis der Rückstand farblos war. CaCO_3 wurde zu Beginn der Extraktion zur Neutralisierung der organischen Säuren zugegeben. Der Pigmentrohextrakt wurde anschließend im Rotationsverdampfer vollständig eingengt und in Aceton aufgenommen.

Die Trennung der Pigmente erfolgte dünnschichtchromatographisch. Die Beschichtung der Glasplatten erfolgte mit einem Dünnschichtstreichgerät (DESAGA, Heidelberg). Die Schicht der Platten hatte folgende Zusammensetzung

20 g	Kieselgel G
12 mg	Ca(OH)
40 ml	Ascorbinsäure (5×10^{-3} M)

Die Platten wurden 30 min lang bei 100°C getrocknet. Der in Aceton aufgenommene Pigmentrohextrakt wurde mit einer Pipette aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Gemisch von

Petroleumbenzin	100 ml
Isopropanol	10 ml
H ₂ O	0,25 ml

verwandt.

Nach der Trennung der Pigmente wurden die pigmenthaltigen Zonen sofort quantitativ abgekratzt und vom Schichtmaterial eluiert. Die Pigmente der einzelnen Zonen sind in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen worden.

Zone 1	: Carotine	Chloroform
Zone 1 - 4	: Chlorophylle	Aceton
Zone 5 - 8	: Xanthophylle	Äthanol

Die Pigmente der einzelnen Zonen wurden in gleichen Volumina gelöst, so daß aus den Absorptionsspektren eine Aussage über den Pigmentgehalt in den Kulturen gemacht werden kann.

Die Absorptionsspektren wurden im Aminco DW 2- Spektralphotometer von 300 bis 550 nm aufgezeichnet. Für die Identifizierung der verschiedenen Xanthophylle wurden den in Äthanol gelösten Pigmenten einige Tropfen 0,1 n HCl zugegeben. Nach Ablauf der De-Expoxidierungsreaktionen wurde ein erneutes Spektrum aufgenommen.

5,6 -Monoepoxide zeigen eine Verschiebung der Absorptionsmaxima um 21nm; die charakteristische Verschiebung der 5,6,5', 6' - Diepoxide beträgt 40 nm (HAGER, 1967).

3.8. Bestimmung der Quantenausbeute

Die Bestimmung der Quantenausbeute von SW- und ST-Kulturen von Scenedesmus wurde im linearen Teil der

Photosynthese-Intensitätskurve in der von SENGER (1970 b; 1971) detailliert beschriebenen Weise durchgeführt.

Die Absorptionsmessung der Algensuspension (30 μg Chlorophyll/ml Puffer) erfolgte im monochromatischen Licht von 679 nm Wellenlänge in einer Ulbricht - Kugel. Als Nullwert bzw. 100% Absorption dienten die gleichen Volumina an Puffer bzw. schwarzer Tusche.

Die Sauerstoffentwicklung wurde monometrisch in Allglas-Differentialmanometer (Warburg Puffer Nr. 9) bei gleichen Intensitäten und gleicher Wellenlänge bestimmt.

3.9. CO₂- Fixierung ganzer Zellen

Die Bestimmung der lichtinduzierten CO₂- Aufnahme in ganze Zellen erfolgte anhand von ¹⁴C- markiertem Bicarbonat. Es wurden Algen (10 μg Chlorophyll/ml) in Phosphatpuffer vom pH 7,0 suspendiert. Ferner waren im Puffer noch folgende Salze enthalten:

MgCl ₂	1	$\times 10^{-3}$ M
NaCl	2,5	$\times 10^{-3}$ M

Das Einspritzen von NaH¹⁴CO₃ setzte die Reaktion nach einer Vorbelichtungszeit von 5 min in Gang. Die Reaktion lief bei einer Raumtemperatur von 20°C im Reagenzglas ab. Die Belichtung der Algen erfolgte mit einem Projektor (Prado Universal) im Rotlicht (> 620 nm). Die Lichtintensität betrug $0,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Ein Magnetrührer verhinderte die Sedimentation der Zellen.

Die CO₂- Aufnahme wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt. Am Ende der Reaktionszeit wurden 0,1 ml 6 molarer Essigsäure in das Reagenzglas hinzupipettiert und auf diese Weise die Reaktion gestoppt. Eine Wasserstrahlpumpe saugte sich verflüchtigendes, nicht gebundenes ¹⁴CO₂ ab und leitete es in KOH. Den entnommenen Proben sind 5 ml einer Szintillationsflüssig-

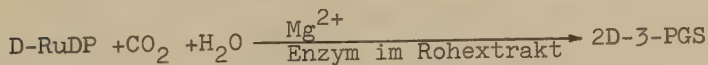
keit hinzugegeben worden. Die Szintillationsflüssigkeit enthielt folgende Komponenten:

Dioxan	1 l
2,5 Diphenyloxazol	4 g
2,2' -p- Phenylen -bis-5-phenyloxazol (POPOP)	75 mg
Naphtalin	100 g
(Merck, Darmstadt)	

Die markierten Algen wurden mit der Szintillationsflüssigkeit in ein Zählgefäß geschüttet und die Radioaktivität in einem Packard Tri-Carb (Modell 3380) Flüssigkeitsszintillations- Spektrometer gemessen.

3.10. Bestimmung der Enzymaktivität der Ribulose-1,5- Diphosphatcarboxylase

Der Bestimmung der Enzymaktivität der RuDPC-ase liegen die Angaben von BJÖRKMAN (1968) und CHU und BASSHAM (1973) zugrunde. Bei dieser Reaktion erfolgt die Fixierung von ^{14}C von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in ein säurestabiles Produkt in Gegenwart von RuDP.



a) Herstellung des Rohextraktes

Es wurden 180 μl Algen der SW- Kulturen bzw. 240 μl Algen der ST- Kulturen vom Nährmedium abzentrifugiert und in 2 ml kalter Pufferlösung mit folgender Zusammensetzung aufgenommen:

Tris - HCl	5×10^{-2} M	pH 7,5
Gluthathion (GSH)	5×10^{-3} M	
MgCl_2	1×10^{-2} M	
EDTA	2×10^{-4} M	

Die Algensuspension wurde 8 min mit Glasperlen vom

Ø 0,7 mm in einem 6,7 ml Stahlbecher in der Vibrogen Zelmühle bei +3°C geschüttelt.

Das Filtrat, das man nach der Abtrennung der Glasperlen erhielt, zentrifugierte man 10 min bei 30000 g und +2°C in einer Beckmann Kühlzentrifuge (Modell J-21-B) ab, um ganze Zellen, Zellreste und Partikel zu sedimentieren. Der Rohextrakt befand sich im Überstand. Pro Reaktionszusatz wurden 0,1 ml des dekandierten Überstandes zugesetzt.

Alle Bestimmungen der Enzymaktivität sind innerhalb von 30 min vom Zeitpunkt des Aufbruches an durchgeführt worden. In folgenden frisch angesetzten Reaktionsansatz pipettierte man 0,1 ml (eingestellt auf 0,18 mg Protein) des Enzymrohextraktes.

In 0,4 ml- Lösung waren enthalten:

RuDP	0,15 x 10 ⁻⁶ M	(Sigma, St. Louis)
GSH	1,25 x 10 ⁻⁶ M	(Merck, Darmstadt)
EDTA	0,1 x 10 ⁻⁶ M	(" ")
Tris - HCl	1 x 10 ⁻⁵ M	(" ")
Mg Cl ₂	8 x 10 ⁻⁶ M	(" ")

Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 2,5 µmol NaH¹⁴CO₃ (0,5 µcurie/mol). Bei den Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der RuDPC-ase waren die Lösungen auf folgende pH-Werte eingestellt: 7,2; 7,5; 7,8; 8,0; 8,2; 8,5; 8,9. Die Inkubationszeit betrug 5 min; die Temperatur 25°C. Nach Vorversuchen befindet sich die Reaktion nach 5min noch im linearen Bereich des Anstieges. Die Reaktion wurde, wie

oben beschrieben, mit 6-molarer Essigsäure abgestoppt und 5 ml Dioxan-Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben. Die Messung erfolgt im Packard Flüssigkeit-Szintillations-Spektrometer.

Für die Bezugswerte wurden die Proteine nach LAYNE (1957) nach dem von LOWRY (1951) entwickelten Verfahren spektralphotometrisch mit dem Folinreagenz

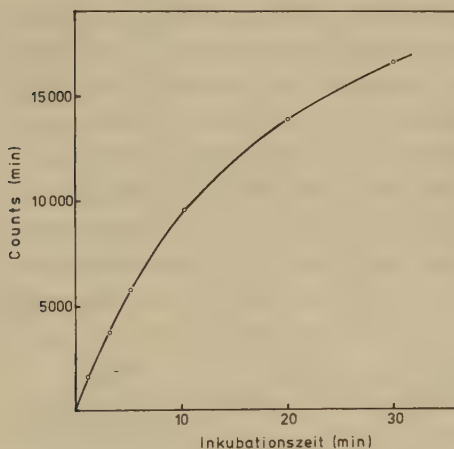


Fig. 4: Abhängigkeit der RUDPC-ase- Aktivität einer Schwachlichtkultur von der Inkubationszeit. Die Versuchstemperatur betrug 25°C. Der Reaktionsansatz war auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

bestimmt.

3.11. Cytochrombestimmung und Cyt f- Oxidation

a) chemisch induzierte Differenzspektren

Die Messung der chemisch induzierten Differenzspektren erfolgte in einem Aminco-Chance DW- 2 Spektralphotometer im "Split-Beam" Verfahren. Dabei durchdringt identisches Meßlicht Referenz- und Probenküvette, und es wird die Extinktionsdifferenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge schreibend registriert. Vor der Behandlung der Proben mit Oxidations- bzw. Reduktionsmittel zeichnet man über den Wellenbereich von 530 nm - 580 nm die Nulllinie auf: d.h. in diesem Bereich sollte die Extinktionsdifferenz gleich Null sein. Zur Methode der Cytochrombestimmung sei auf die Arbeit von BENDALL (1968) und FRICKEL-FAULSTICH (1974) verwiesen.

FRICKEL-FAULSTICH hat die Cytochrombestimmung bei Untersuchungen des Cytochromgehaltes in Scenedesmus-Synchroinkulturen verwandt und methodisch in unserem Labor standardisiert.

Es wurde in der mehrfach beschriebenen Weise eine Partikelsuspension in der Zelmühle hergestellt (Puffer: 0,1 M Tris HCl). Die Chlorophyllkonzentration der zellfreien Suspension ist auf 70 μg Chlorophyll/ml eingestellt worden. Mit folgenden Redoxreagenzien sind die Proben chemisch behandelt worden:

D: Natriumdithionit	: wurde in geringen Mengen als feste Substanz den Proben zugegeben
A: Ascorbat (pH 7,0)	: 1×10^{-3} M
HQ: Hydrochinon	: 1×10^{-3} M
F: Kaliumhexacyanoferrat ^{III}	: 1×10^{-3} M

Die in der Photosynthese wirksamen Cytochrome besitzen

im reduzierten Zustand im Bereich von 550 nm - 565 nm ein Maximum im Absorptionsspektrum (α -Bande). Da die oxidierte Form hier kein Maximum erkennen läßt, kann die Höhe des Absorptionsmaximums der reduzierten Form im Vergleich zur oxidierten als Maß der Cytochrommenge gewertet werden. Aus den nachgenannten Spektren wurden die Cytochrome bestimmt.

Cyt f : $E_{554} \cdot 0,3 \times E_{559}$; HQ - F Spektrum
 Cyt b₅₅₉ HP : E_{559} ; HQ - F Spektrum
 Cyt b₅₅₉ LP : $E_{559} - 0,3 \times E_{563}$; D - HQ Spektrum
 Cyt b₅₆₃ : $E_{563} - 0,5 \times E_{559}$; D - HQ Spektrum
 korrigiertum Cyt b₅₅₉ aus dem A - HQ Spektrum

Der Auswertung der chemisch induzierten Differenzspektren liegen folgende Extinktionskoeffizienten zugrunde:

Cytochrom f : $= 17,7 \text{ cm}^2 \times \text{mM}^{-1}$
 Cytochrom b₅₅₉ : $= 20,0$ "
 Cytochrom b₅₆₃ : $= 20,0$ "

b) Lichtinduzierte Cytochromabsorptionsänderungen

An ganzen Zellen oder an Partikelsuspensionen kann man neben der Cytochrombestimmung noch die Kinetiken der an der Reaktion beteiligten Cytochrome verfolgen. Die schnellen Absorptionsänderungen wurden in einem Aminco-Chance DW-2- Spektralphotometer im "Dual Wavelength" Verfahren im Verlaufe der Anregung geschrieben.

Als Referenzwellenlänge wird der isosbestische Punkt bei 540 nm bzw. 570 nm und als Meßlicht die maximale Absorption bei 554 nm gewählt. Die Strahlung einer Wolframlampe wird über ein Spiegelsystem auf zwei Monochromatoren gerichtet. Das monochromatische Licht beider Monochromatoren wird von einem zweiten Spiegelsystem so abgelenkt, daß beide Lichtstrahlen alternierend durch die Probenküvette fallen. Die Probe

wird zur Anregung rechtwinkelig zum Meßstrahl von einem Projektor belichtet.

In den Versuchen der lichtinduzierten Cytochromdifferenzspektren waren folgende Filter im Strahlengang des Anregungslichtes angeordnet. Ein DAL-Filter (Schott, Mainz) mit einer maximalen Durchlässigkeit von (T_m) 36% bei 716 nm und einer HW von 14 nm gewährleistete die alleinige Anregung von Photosystem I. Bei einigen Versuchen fiel das Anregungslicht durch ein Plexiglasfilter (durchlässig oberhalb 620 nm) oder durch ein Interferenzfilter 640 nm (Schott, Mainz, T_m = 35%; HW = 14 nm).

Ein elektromagnetisch gesteuerter Photoverschluß (Compur Electronic - m, Prontor Werk, Calmbach) war in das Zwischenringsystem der Projektoroptik eingebaut. Mit Hilfe eines Steuergerätes konnten über ein hinzugeschaltetes Zeiteinstellgerät die Öffnungszeiten des Verschlusses gewählt werden.

Ein Corningglasfilter (C.S. 4.96 9950061, durchlässig von 380 - 580 nm, Sovirel) war nur für das Meß- bzw. Referenzlicht durchlässig und schützte den Photomultiplier vor etwaigem Anregungslicht. Die Lichtintensitäten betrugen:

mit DAL 716	:	$2,07 \times 10^4$	erg x cm^{-2} x sec^{-1}
IL 640	:	$4,2 \times 10^4$	" "
Rotlicht (620)	:	$5,2 \times 10^5$	" "

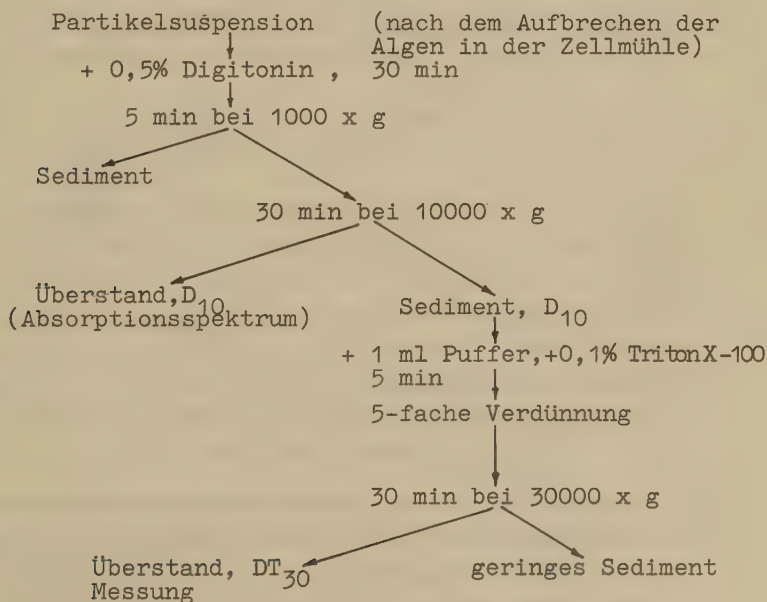
3.12. Bestimmung des Chl/P₇₀₀-Verhältnisses in Subpartikeln

Herstellung der Subpartikel

Es wurden 300 µl Algen in 2 ml kalter Pufferlösung aufgenommen. Die Pufferlösung enthielt:

Tricine	5×10^{-2} M	:	pH 7,2
KCl	0,15	M	
Saccharose	0,35	M	

Die Algensuspension wurde in einem 6,7 ml Stahlbecher in einer Zelmühle mit Glasperlen $\varnothing$ 0,7 mm 5 min lang gemahlen. In Anlehnung an das Verfahren von GRIMME und BOARDMAN (1973) ist dann die Partikelsuspension, die keine ganzen Zellen enthielt, 30 min lang bei 0°C mit 0,5% Digitonin incubiert worden. Anschließend folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1000 x g. Der Überstand wurde einer weiteren Zentrifugation von 30 min bei 30000 x g unterworfen. Die sedimentierten Partikel wurden entweder im Aufbruchmedium resuspendiert oder in einem Phosphatpuffer (0,05 M: pH 7,0: + 0,3 M Saccharose: 0,15 M KCL) aufgenommen und mit Triton X-100 (0,1%) 5 min lang incubiert. Nach einer fünffachen Verdünnung zentrifugierte man diese Subpartikel 30 min lang bei 30000 x g und setzte den Überstand in den Messungen ein. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Beckman Kühlzentrifuge (Typ J-21-B) durchgeführt. Das nachfolgende Schema zeichnet den Weg der Partikelfraktionierung nach.



Die Messung des P_{700} - Gehaltes einer Scenedesmus-Partikelfraktion erfolgte mittels eines durch chemische Behandlung erzeugten - oxidiert (Ferricyanid : 1 mM) gegen reduziert (Ascorbat : 10 mM) Differenzspektrums (MARSHO und KOK, 1971). Dazu wurde die Nulllinie in einem Aminco- Chance DW-2 Spektralphotometer über den Wellenlängenbereich von 650 - 750 nm mit identischen Proben nach der "Split-Beam" -Methode aufgezeichnet. Nach der Zugabe der Oxidations- bzw. Reduktionsmittel wurde die Absorption bei 750 nm auf den gleichen Wert eingestellt und das chemisch induzierte Differenzspektrum registriert. Gemessen wurde die maximale Absorptionsdifferenz bei 696 nm: der Auswertung liegt ein millimolarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 64 \text{ cm}^2 \times \text{mM}^{-1}$ zugrunde.

Von den Partikelfraktionen D_{10} und DT_{30} sind Absorptionsspektren bei 20°C oder Tieftemperaturspektren in einem Shimadzu - MPS- 50 L aufgezeichnet worden. (Fig.5)

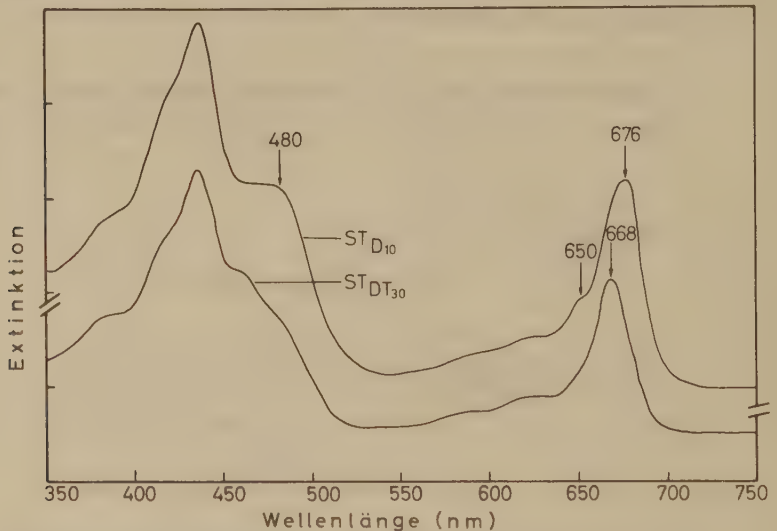


Fig. 5: Absorptionsspektren der Subpartikelfraktionen einer Starklichtkultur von Scenedesmus obliquus. Die Pfeile zeigen die Verschiebung des DT_{30} -Spektrums nach der Triton X-100- Behandlung der D_{10} -Partikel (Raumtemperatur).

Die Photosystem I- Aktivität der DT₃₀- Partikel wurde als Sauerstoffaufnahme von Methylviologen polarographisch bestimmt. Als künstlicher Elektronendonator wurde durch Ascorbat reduziertes DCPIP (s. Kap.1.6.) eingesetzt.

3.13. Absorptionsänderung bei 520 nm

Die Messung des "520 nm - Change" wurde ebenfalls in einem Aminco - Chance Spektralphotometer vorgenommen. Algen (10 µg Chlorophyll/ml) wurden in Phosphatpuffer (pH 7,0; 0,05 M) suspendiert. Die Messung erfolgte im "Split-Beam" Verfahren.

Zwei identische Lichtstrahlen fallen dabei durch Referenz- und Probenküvette. Die Probenküvette wird rechtwinkelig zum Meßlicht mit Rotlicht oberhalb 620nm ($5,2 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$) belichtet und so lichtinduzierte Absorptionsdifferenzen bei 520 nm über einen bestimmten Zeitraum hinweg geschrieben.

Alle Untersuchungen sind bei einer Raumtemperatur von 20°C durchgeführt worden. Als Hemmstoffe wurden DCMU und DBMIB den Proben zugegeben.

3.14. Lichtinduzierte Konformations- und Volumenänderungen

Scenedesmus- Algen wurden abzentrifugiert und in frische Nährlösung resuspendiert. Die Suspensionsdichte betrug 2 µlPCV/ml. Mit Hilfe des Streulichtmeßverfahrens wurden die Konformationsänderungen der einzelligen Algen in einem Licht - Dunkel Differenzspektrum in einem Aminco DW-2 Spektralphotometer registriert. Die Wellenlänge des Meßlichtes betrug 540 nm: der Küvettenabstand vom Multiplier 10 cm.

Die Probenküvette mit den Algenzellen wurde seitlich mit Rotlicht (620 nm) angeregt. Ein Corningglasfilter (Sovirel C.S. 4. 96.; durchlässig 380 - 580 nm) schützte den Photomultiplier vor dem Anregungslicht.

Volumenabnahmen äußern sich als Extinktionszunahmen; Volumenzunahmen werden als Extinktionsverringerungen registriert.

Für weitere Einzelheiten und Diskussion der Meßtechnik siehe SCHÄFER (1975).

3.15. Homokontinuierliche Kulturen einzelliger Grünalgen

Nach einer Definition von SENGER et al. (1972) besitzt jede Zelle in homokontinuierlichen Kulturen einen individuellen Lebenszyklus. Alle Lebenszyklen sollten dabei einer gleichen statistischen Verteilung folgen; d.h. zu allen Zeiten ist die gleiche Zahl der Entwicklungsstadien zu fordern. Homokontinuierliche Kulturen bieten daher für physiologische Untersuchungen, bei denen ein Parameter verändert wird, optimale Voraussetzungen.

Die Algen werden ständig belichtet - es findet kein Licht - Dunkel Wechsel statt - und mit Hilfe einer automatisch arbeitenden Verdünnungsanlage werden die Anzuchtbedingungen konstant gehalten.

4. EXPERIMENTELLER TEIL UND DISKUSSION

4.1 Voruntersuchungen

Für die gestellte Aufgabe war es notwendig, optimale Kulturbedingungen zu bestimmen, unter denen die homokontinuierlich wachsenden Algen angezogen werden sollten. In den Voruntersuchungen mußte die Frage geklärt werden, inwieweit sich die einzellige Grünalge Scenedesmus an extreme Lichtbedingungen anzupassen vermag. Weiterhin war es wichtig zu wissen, welchen Einfluß die verschiedenen Kulturdichten bei gleicher Lichtintensität auf die Photosynthesekapazität ausüben. Es wurde eine möglichst hohe Zellzahl/ml für die Anzucht angestrebt, da für einzelne physiologische Untersuchungen viel Zellmaterial benötigt wurde, es jedoch nicht möglich war, den sterilen, automatisch verdünnten Kulturen in kurzen Abständen größere Proben zu entnehmen.

Die Photosynthesekapazitäten der Kulturen bei gleicher Beleuchtungsintensität und verschiedenen Dichten, sowie bei veränderter Beleuchtung, wurden anhand der Zuwachsrates (ml Überlauf / Stunde) gemessen (SENGER und PFAU, 1972). Der Überlaufeinsatz der Kulturröhren mit automatischer Verdünnung war so eingestellt, daß sich in den Röhren je 250 ml Algensuspension befanden. Die Zuwachsraten der Kulturen in Abhängigkeit von den Beleuchtungsintensitäten und den Kulturdichten sind in Fig. 6 dargestellt.

Aus der Abbildung geht hervor, daß Kulturen, die mit höheren Lichtintensitäten bestrahlt werden, eine höhere Substanzproduktion aufweisen. Verfolgt man den Kurvenverlauf der Kulturen gleicher Intensität, so ist die Zuwachsrates bei geringeren Dichten höher als bei Kulturen mit größerer Dichte, da der Lichtgenuß der Einzelzelle ansteigt. In dichter werdenden Algensuspensionen beschatten sich die Zellen in zunehmendem Maße.

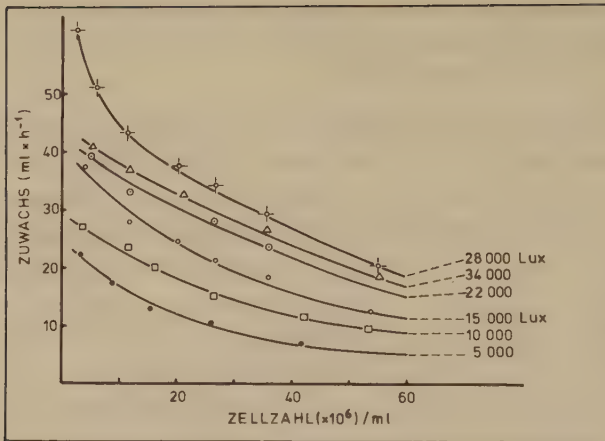


Fig. 6: Zuwachsraten homokontinuierlicher Kulturen von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit von der Kulturdichte. Die homokontinuierlichen Kulturen wurden unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogen. Die Temperatur während des Wachstums betrug 30°C . Das Volumen der Algensuspension pro Kulturröhre war auf 250 ml eingestellt.

Fig. 6 kann man entnehmen, daß die Zuwachsrate der am stärksten bestrahlten Kultur (34000-Lux) geringer ist, als die der mit 28000-Lux belichteten. In den Chloroplasten der 34000-Lux-Kultur beginnen offenbar bereits Photooxidationsprozesse, die zu einem Rückgang der Substanzentwicklung führen.

In dünnen 28000-Lux-Kulturen konnten lichtmikroskopisch neben den üblichen Autosporenzahlen einer Scenedesmus- Kultur vereinzelt 10 und 12 Autosporen pro Mutterzelle beobachtet werden. Diese Beobachtung wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von synchronisierten Scenedesmus- Zellen erhärtet, wo vor der Freisetzung mehr als 8 Autosporen in den Autosporenmutterzellen gezählt werden. Die Zunahme der

Substanzproduktion führt demnach neben der von PFAU und SENGER (1972) berechneten Zyklenverkürzung auch zur Freisetzung von mehr als 8 Autosporen.

Die Abhängigkeit der O_2 -Entwicklung / Chlorophyll und Zeit von der Kulturdichte einer 28000-Lux und einer 5000-Lux- Kultur ist in Fig. 7 dargestellt.

Die Sauerstoffentwicklung der Kultur unter Starklichtanzucht ist bei Dichten bis 6×10^7 Zellen/ml Nährmedium etwa 2,5 mal größer als die der 5000-Lux-Kultur. Danach verringert sich die O_2 -Entwicklung rasch und fällt in sehr dichten Suspensionen sogar unter die der 5000-Lux- Kultur. Die Frage, weshalb in

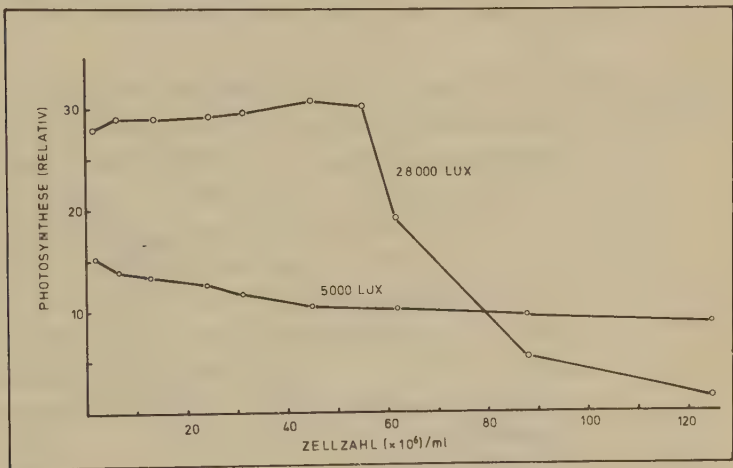


Fig. 7: Photosyntheseleistung (polarographisch) einer 28000-Lux und einer 5000-Lux- Kultur von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit von der Kulturdichte während der Anzucht. Die Photosynthese wurde als Sauerstoffentwicklung im Oxygraph unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5$ erg $\times$ cm $^{-2}$ $\times$ sec $^{-1}$ gemessen. Die Zellen waren in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 (20 μ gChl/ml) suspendiert. Die Temperatur betrug während der Anzucht und Messung 30°C.

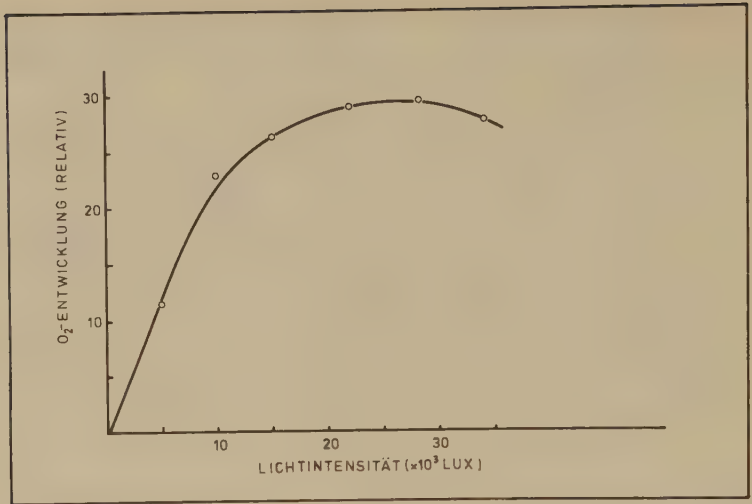


Fig. 8: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung (polarographisch) homokontinuierlicher Kulturen von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit von der Lichtintensität der Anzucht. Die Zellen waren in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 ($20 \mu\text{g Chl/ml}$) suspendiert. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Temperatur betrug während Anzucht und Messung 30°C . Die Dichte der Kulturen war während der Anzucht auf $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

der automatisch verdünnten Kultur die O_2 -Entwicklung so plötzlich absinkt, wurde nicht näher untersucht, doch dürften m.E. ernährungsphysiologische Probleme auftreten.

Für alle weiteren Untersuchungen wurden die Kulturen auf eine Dichte von $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml in der Verdünnungsanlage eingestellt. Dies erwies sich als günstiger Kompromiß zwischen den physiologischen Veränderungen der Kulturen einerseits und der bestmöglichen Handhabung der Probenentnahme andererseits.

Die Sauerstoffentwicklung / Chlorophyll und Zeit der Kulturen gleicher Dichte in Abhängigkeit von der Beleuchtungsintensität während der Anzucht steigt von der 5000-Lux- Kultur steil an (Fig. 8). Die Kurve flacht dann zunehmend ab und sinkt schließlich auf den Wert der 34000-Lux- Kultur ab. Für die Abnahme der Sauerstoffentwicklung dürften die erwähnten Prozesse der Photooxidation verantwortlich sein.

Der Gesamtchlorophyllgehalt der Scenedesmus-Zellen, die bei unterschiedlichen Beleuchtungsintensitäten angezogen werden, verändert sich (Fig. 9). Der Chlorophyllgehalt der Einzelzelle nimmt mit steigender Lichtintensität ab und ist in einer 5000-Lux- Kultur nahezu doppelt so hoch wie in einer 34000-Lux- Kultur.

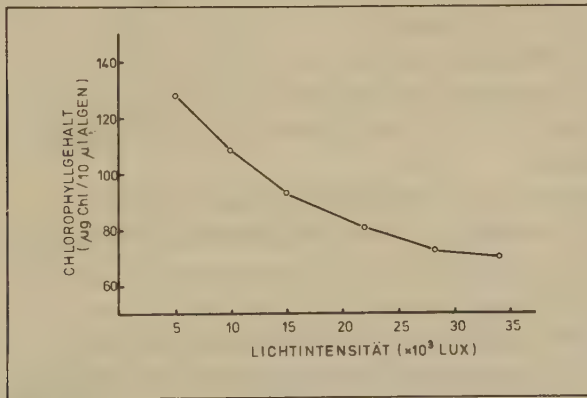


Fig. 9: Chlorophyll (a+b)- Gehalt homokontinuierlicher Kulturen von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit von der Beleuchtungsintensität während der Anzucht. Die Kulturdichte betrug $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen waren zu $10 \mu\text{l}$ PCV vom Nährmedium abzentrifugiert worden.

Die Sauerstoffentwicklung der 28000-Lux- Kultur verzeichnet bei 30°C einen relativ höheren Anstieg als die O₂- Freisetzung der 5000-Lux- Kultur (Fig. 10b). Der rasche Abfall der Photosyntheseleistung bei 35°C muß auf die Inaktivierung temperatursensitiver Enzyme zurückgeführt werden. Die Voruntersuchungen an homokontinuierlichen Scenedesmus- Kulturen haben hinsichtlich der Kultivierung unter verschiedenen Bestrahlungsintensitäten vielfach gefundene Ergebnisse bestätigt und können unter dem Gesichtspunkt der Fragestellung folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Der Chlorophyllgehalt pro Einzelzelle ist in Scenedesmus- Kulturen, die unter niedrigen Lichtintensitäten wachsen, höher als in den stärker beleuchteten.
2. Die O₂- Entwicklung / Chlorophyll der 28000-Lux- Kultur ist mehr als 2 mal so groß wie die der 5000-Lux-Kultur.
3. Die Substanzproduktion der 28000-Lux- Kultur ist höher als in den anderen Kulturen dieser Versuchsreihe.
4. Das Temperaturoptimum liegt bei 30°C.
5. Als günstigste Kulturdichte wurde eine Dichte von $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml bestimmt.

Für die physiologischen Untersuchungen der Veränderungen des Photosyntheseapparates wurden Scenedesmus- Zellen unter 28000- und 4000-Lux kultiviert. Definitionsgemäß sollen erstere als Starklicht- letztere als Schwachlichtkulturen bezeichnet werden.

Die Temperatur des Wasserbades, in denen die Kulturröhren standen, wurde konstant auf 30°C gehalten. Der Kohlendioxidgehalt in der Luft, mit der die Algen-suspension durchperlt wurde, betrug 3%. Die Kulturdichte der Stark- und Schwachlichtkulturen betrug $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml.

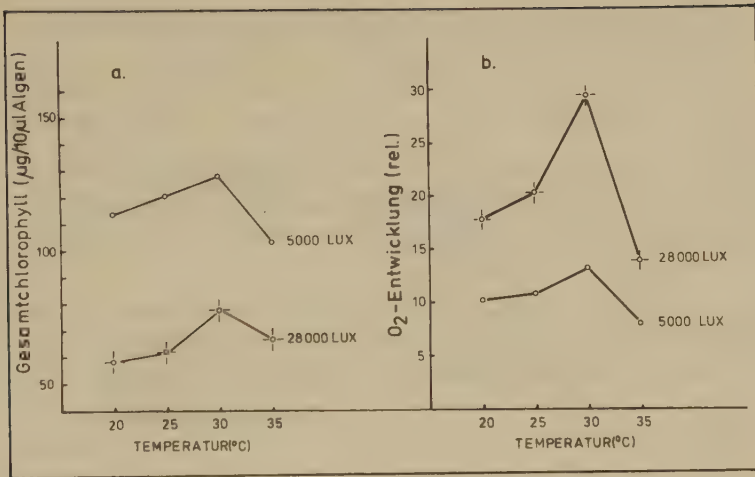


Fig. 10a) : Chlorophyll(a+b)- Gehalte einer 28000-Lux- und einer 5000-Lux- Kultur in Abhängigkeit von der Temperatur der Anzucht. Die Kulturdichte betrug $31,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen waren zu $10 \mu\text{l}$ PCV vom Nährmedium abzentrifugiert worden

Fig. 10b) : Photosynthetische Sauerstoffentwicklung (polarographisch) einer 28000-Lux- und einer 5000-Lux- Kultur (Kulturdichte: $31,2 \times 10^6$ Zellen von Scenedesmus obliquus in Abhängigkeit der Anzuchttemperatur. Die Zellen waren in $0,05 \text{ M}$ Phosphatpuffer pH 7,0 ($20 \mu\text{g}$ Chl/ml) suspendiert. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

4.2. Charakterisierung einer Stark- und Schwachlichtkultur

4.2.1. Pigmentanalyse

Der Chlorophyllgehalt ist in der Scenedesmus- Zelle, die unter Schwachlichtbedingungen wächst, höher als in Starklichtzellen (Fig. 11)

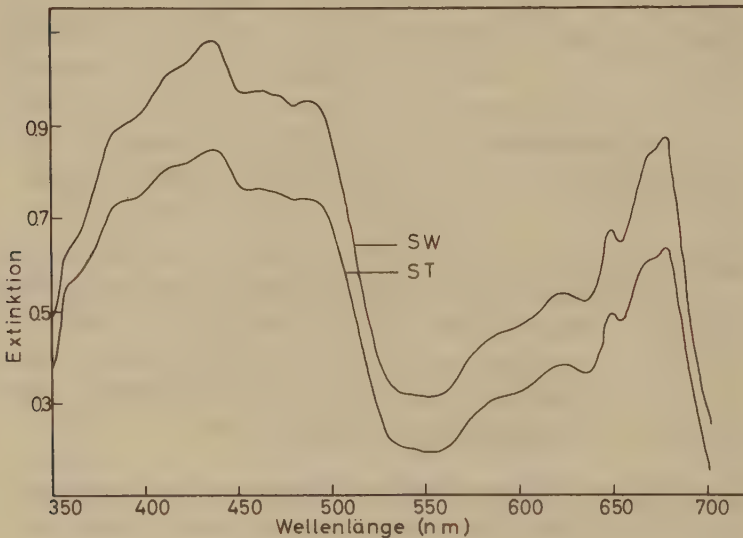


Fig. 11: Tieftemperatur- Absorptionsspektren ganzer Zellen von homokontinuierlichen Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Messungen wurden in 1 mm Küvetten mit einer Dichte von 30 μ l PCV pro ml Nährmedium durchgeführt.

In Tab. 2 sind die Chlorophyll- und Carotinoidwerte einer Meßreihe beider Kulturtypen zusammengefaßt. Die Algen, die vom Schrägagar abgeimpft worden sind, weisen als Flüssigkeitskulturen innerhalb der ersten 10 Tage noch Synchronisationseffekte auf (SENGER und

		Ges. Chl.	Chl.a	Chl.b	Chl.a/b	Ges. Car.	Ges.Chl/ Ges.Car
SW	11.Tag	157,6	112,4	44,9	2,51	15,9	9,91
	60.Tag	161,1	114,1	46,5	2,45	15,9	10,13
ST	11.Tag	75,6	55,6	20,2	2,72	9,9	7,63
	60.Tag	77,8	57,7	20,9	2,72	10,6	7,33

Tab. 2: Chlorophyll- und Carotinoidgehalt ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ PCV Algen) einer Stark- und Schwachlichtkultur von Scenedesmus.

WOLF, 1964). Nach dieser Adaptierungsphase an die veränderten Wachstumsbedingungen liegt die gleiche statistische Verteilung der Entwicklungsstadien vor.

Der Gesamtchlorophyllgehalt der SW- und ST- Kulturen zeigt vom 11. - 60. Tag nur unwesentliche Schwankungen. Während das Chlorophyll a/b- Verhältnis der ST- Zellen konstant blieb, verringerte sich das Chl a/b- Verhältnis der unter Schwachlicht gehaltenen Algen geringfügig. Im Vergleich beider Kulturtypen ist in den Schwachlichtzellen mehr Chl b vorhanden als in den Starklichtzellen.

Die SW- Kulturen enthalten absolut mehr Carotinoide; bezogen auf den Chlorophyllgehalt ist der Quotient Ges. Chl/ Ges. Car. in den ST- Zellen kleiner als in den SW- Zellen. Das Verhältnis Ges. Chl/Ges.Car. nimmt in den SW- Kulturen vom 11. - 60. Tag leicht zu; im selben Zeitraum nimmt der Quotient bei den ST- Kulturen ab - d.h., es erfolgt eine weitere Synthese an Carotinoiden.

Um einen Überblick über die Carotinoidverteilung in den SW- und ST- Kulturen von Scenedesmus zu erhalten, wurden Algen (100 μl PCV) in Methanol extrahiert, der Rohextrakt eingeengt und in Aceton aufgenommen und dünnschichtchromatographisch getrennt. Es traten insgesamt 8 Pigmentbanden auf. Die Pigmente der Carotinoid-

zonen wurden spektralphotometrisch identifiziert und mengenmäßig vergleichend ausgewertet.

Die Absorptionsmaxima der 1. Xanthophyllzone (4. Bande im Chromatogramm) liegen bei 447/447,5 und bei 474,5/475 nm (Fig. 12). Eine Schulter ist bei 422 nm erkennbar. Der Schnelltest mit 0,1 n HCl fällt negativ aus. Die Lage der Maxima und die negative HCl-Reaktion sind ein Indiz dafür, daß es sich bei den Pigmenten um Lutein und Zeaxanthin handelt.

Daraus ergibt sich für diese Pigmente folgendes Bild. In den SW-Kulturen sind zwar absolut geringfügig mehr Lutein und Zeaxanthin vorhanden: bezieht man aber den Pigmentanteil auf Chlorophyll, so sind überdurchschnitt-

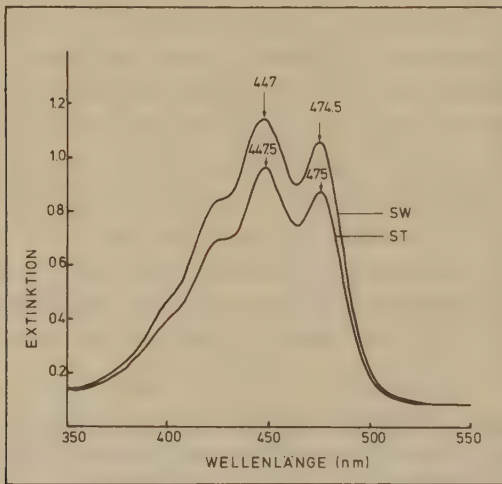


Fig. 12: Absorptionsspektren der ersten Xanthophyllzone eines Verteilungschromatogramms von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus obliquus. Die Zellen waren zu 100 µl PCV vom Nährmedium abzentrifugiert worden. Die Pigmente der ersten Xanthophyllzone der ST-Kulturen waren in 8,2 ml und die der SW-Kultur in 8,0 ml Äthanol gelöst.

Verdünnung 1:3

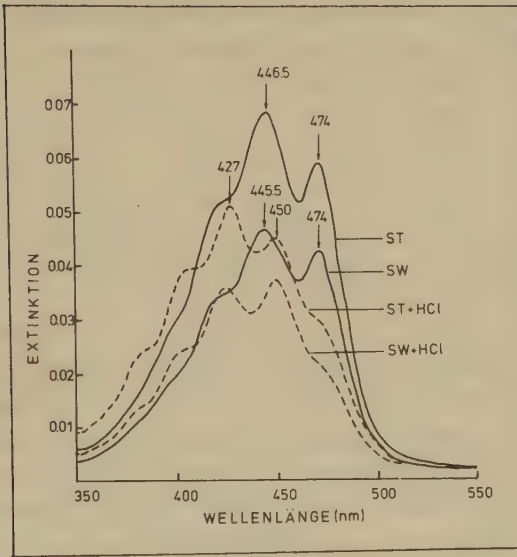


Fig. 13: Absorptionsspektren der zweiten Xanthophyllzone eines Verteilungschromatogramms von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus obliquus. Die Zellen waren zu 100 μ l PCV vom Nährmedium abzentrifugiert worden. Die Pigmente der zweiten Xanthophyllzone waren in 5,4 ml Äthanol gelöst. Verdünnung 1:3.

lich große Mengen an Lutein und Zeaxanthin in den Starklichtzellen auszumachen.

Die zweite Xanthophyllzone ist im Verteilungschromatogramm nur schwach ausgeprägt. Die Maxima des Absorptionsspektrums liegen bei 445,5/446,5 und bei 474 nm (Fig. 13). Die HCl-Reaktion führt zu einer Verschiebung der Maxima um etwa 20 nm. Es handelt sich bei diesem Pigment um das Monoepoxid Antheraxanthin. Bereits aus den verschiedenen Extinktionshöhen ist zu entnehmen, daß Antheraxanthin zum Zeitpunkt der Methanolextraktion in ST- Kulturen absolut - und viel mehr chlorophyllbezogen - in höheren Konzentrationen vorhanden ist als in SW- Kulturen.

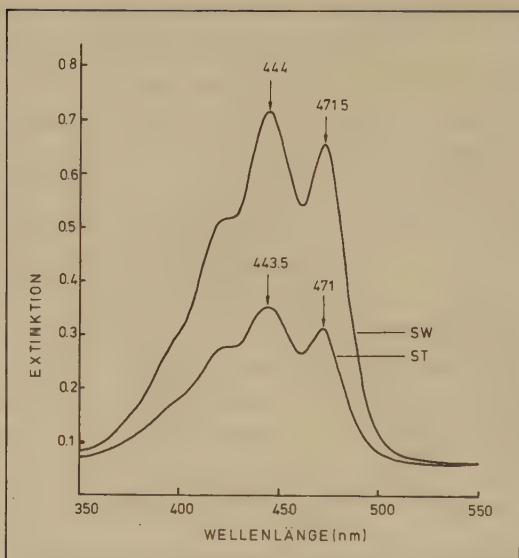
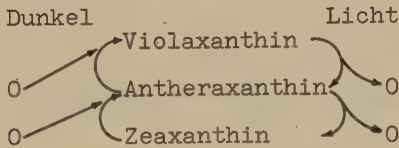


Fig. 14: Absorptionsspektren der dritten Xanthophyllzone eines Verteilungschromatogrammes von Stark- und Schwachlichtkulturen. Die Zellen waren zu 100 μ l PCV vom Nährmedium abzentrifugiert worden. Die Pigmente der dritten Xanthophyllzone waren in 7,3 ml Äthanol gelöst. Verdünnung 1:3.

Das Absorptionsspektrum in Fig. 14 läßt auf die Pigmente Violaxanthin und Luteooxanthin schließen. Die Maxima liegen bei 443/443,5 und bei 471/471,5 nm. Nach der HCl-Behandlung verändern sich die Maxima um etwa 40 nm, und es tritt das typische Absorptionsspektrum von Auroxanthin auf. Auffällig ist der hohe Anteil von Violaxanthin und Luteoxanthin in den Schwachlichtkulturen.

Für die Diskussion dieser Ergebnisse ist die Betrachtung aller Spektren der ersten 3 Xanthophyllzonen notwendig. Nach den Ergebnissen von HAGER (1967) findet bei Belichtung eine reversible Umwandlung von Violaxanthin (=Zeaxanthindiepoxyd) über Antheraxan-

thin in Zeaxanthin statt. Die Umwandlung erfolgt im Licht unter Sauerstoffabspaltung und ist im Dunkeln unter Sauerstoffeinbau in die Molekülstruktur reversibel.



Der lichtabhängige Xanthophyllzyklus Violaxanthin ---- Zeaxanthin wird von der PS II- Aktivität und den Photophosphorylierungsbedingungen bestimmt (HAGER, 1967). SIEFERMANN und YAMAMOTO (1975) zeigten, daß die Umwandlung der Pigmente mit dem Reduktionszustand der Elektronenüberträger, die vor dem limitierenden Schritt zwischen PS II und PS I liegen, korreliert.

Nach diesen Befunden sind die oben beschriebenen Ergebnisse folgendermaßen zu interpretieren:

In den SW- Kulturen, die nach der Entnahme aus den Kulturröhren 5 min abzentrifugiert wurden, vollzieht sich die im Dunkeln ablaufende Rückreaktion von Zeaxanthin hin zum Diepoxid Violaxanthin. Die Schwachlichtkulturen weisen nach der spektralen Verteilung mehr Violaxanthin auf; der Antheraxanthinteil ist aber wesentlich geringer als in den ST- Kulturen. Die Rückreaktion müßte aufgrund der Ergebnisse im Dunkeln in den Schwachlichtkulturen entweder schneller ablaufen, oder aber, und das scheint wahrscheinlicher zu sein, ist der Gehalt an Zeaxanthin in den ST- Kulturen größer als in SW-Kulturen. Das heißt, in den schwachbelichteten Zellen wird weniger Violaxanthin in Zeaxanthin umgewandelt, als in den mit hohen Lichtintensitäten bestrahlten Dauerlichtkulturen.

Inwieweit die lichtbedingte Aktivierung des Enzyms,

das die De-Epoxidierungsreaktion katalysiert, den Umwandlungsprozeß beeinflußt, wurde nicht untersucht. Es ist aber durchaus denkbar, daß der lichtabhängige Plastohydrochinonpool, der in ST- Pflanzen in größerem Umfang vorliegt, zu einer verstärkten pH- Erniedrigung auf der Thylakoidinnenseite führt. Die De-Epoxidase ist bei neutralem pH-Wert inaktiv; bei einer pH-Erniedrigung erfolgt die Aktivierung (HAGER, 1967) SIEFERMANN und YAMAMOTO, 1975).

Demnach sollte im Thylakoidinnenraum eines ST- Chloroplasten ein niedrigerer pH-Wert vorliegen (höhere Protonenanreicherung) als in SW- Chloroplasten.

4.2.2. Photosyntheseleistung

In den Voruntersuchungen hat es sich gezeigt, daß die Sauerstoffentwicklung bezogen auf Chlorophyll in den ST- Kulturen höher ist als in den SW- Kulturen. Da alle vorangegangenen Untersuchungen im Lichtsättigungsbereich durchgeführt worden waren, ist es notwendig, die Photosyntheseleistung in Abhängigkeit von der Beleuchtungsintensität des anregenden Rotlichtes zu verfolgen. Fig. 15 zeigt die polarographisch gemessene O_2 - Entwicklung in Abhängigkeit von der Lichtintensität.

Ein Vergleich beider Kurven läßt das frühzeitige Einschwenken der SW- Kurve in den Sättigungsbereich sichtbar werden. Die Scenedesmus- Zellen, die unter Starklichtbedingungen kultiviert wurden, benötigen deutlich mehr Bestrahlungsintensität für die Absättigung der Reaktion.

Die Sauerstoffproduktion der SW- Kultur ist gegenüber der ST- Kultur unter den gewählten Kulturbedingungen um das dreifache geringer (Tab. 4).

Der schnelle, lineare Anstieg des Kurvenverlaufes bei der Kulturen läßt nach Fig. 14 keine eindeutige Aussage über gleichen oder unterschiedlichen Steigungswinkel zu. Dieser Teil ist daher in einem weiteren Experiment durch zusätzliche Meßpunkte ergänzt worden.

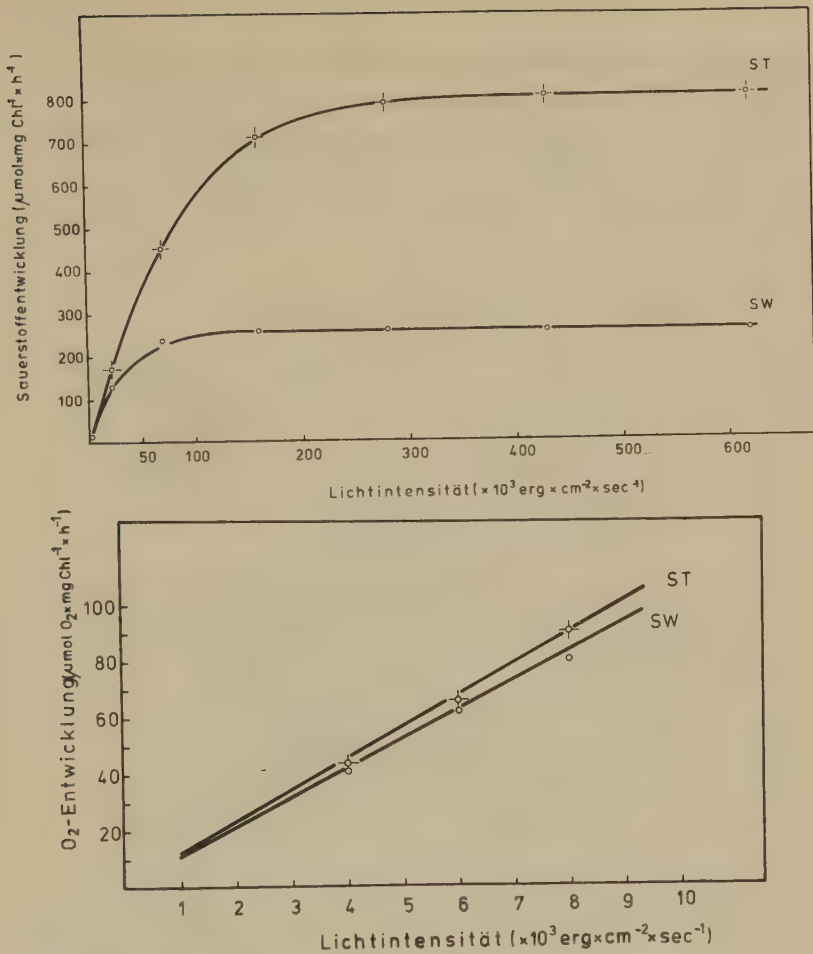


Fig. 15: Photosyntheseleistung (polarographisch) in Abhängigkeit von der Lichtintensität für Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Photosynthese wurde als Sauerstoffentwicklung im Oxygraph unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) gemessen. Die Zellen ($20 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) waren in $0,05 \text{ M}$ Phosphatpuffer pH7,0 suspendiert.

Fig. 16: Photosyntheseleistung (polarographisch) in Abhängigkeit von der Lichtintensität für Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen. Meßbedingungen wie in Fig. 15.

Nach Fig. 16 kann folgende Feststellung getroffen werden: im linearen Bereich der Lichtintensitätskurven von homokontinuierlichen Scenedesmus- Kulturen, die unter verschiedenen Lichtbedingungen wachsen, ist kein Unterschied im Anstieg der Kurvenverläufe festzustellen.

4.2.3. Quantenausbeute der Photosynthese

Wenn im linearen Teil der Anstieg der Lichtsättigungs-Kurven beider Kulturen gleich ist, dürften sich im photochemischen Bereich des Photosynthesemechanismus keine Änderungen ergeben. Die Quantenausbeute im lichtbegrenzenden Teil sollte sich folglich in beiden Kulturtypen nicht unterscheiden.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurde nach dem von SENGGER (1971 b) ausführlich beschriebenen Verfahren vorgegangen. Die SW- und ST- Kulturen sind in einer Konzentration von $90 \mu\text{g}$ Chlorophyll in 3ml Warburg Puffer Nr.9 aufgenommen worden. Von den Proben wurde die prozentuale Absorption in der Ulbricht Kugel und die Photosyntheserate manometrisch als Sauerstoffentwicklung bei bestimmter Energiestrahlung monochromatischen Lichtes (679 nm) gemessen. Die Sauerstoffentwicklung in μmol ist in Abhängigkeit von der Energie (μ Einstein) derselben Wellenlänge / Fläche und Zeit in Fig. 17 aufgetragen.

Die Meßdaten und die errechneten Werte der Quantenausbeute, sowie des Quantenbedarfes (reziproker Wert) sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die Quantenausbeute der ST- und SW- Kulturen von Scenedesmus ist unter den gewählten Kulturbedingungen in beiden Kulturtypen gleich und beträgt durchschnittlich $0,087 \mu\text{mol O}_2 \times \text{Einstein}^{-1}$. Der Quantenbedarf für die Freisetzung von einem $\mu\text{mol O}_2$ liegt bei 11,45 in den SW- Kulturen und bei 11,27 in den ST- Kulturen. Bei geringen Lichtintensitäten des Anregungslichtes

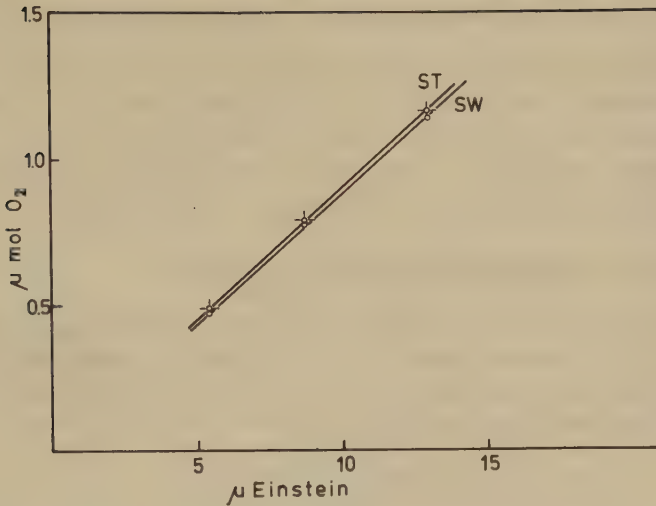


Fig. 17: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung (manometrisch) von Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus in Abhängigkeit der absorbierten Quanten monochromatischer Strahlung (679 nm). Die Messung erfolgte in Warburg-Puffer Nr. 9.

O ₂ - Entw. (μmol)*						
μE*	% Absorption		korr. für 100%		Qu- Ausbeute	
	SW	ST	SW	ST	SW	ST
5,465	74,6	74,4	0,472	0,485	0,086	0,087
8,705	77,23	77,39	0,768	0,772	0,088	0,088
13,05	77,87	79,01	1,143	1,157	0,087	0,088

* Die Energieangaben und die Angaben der Sauerstoffentwicklung beziehen sich auf die Meßdauer von 5 min und auf dasselbe Warburg-Gefäß.

Tab. 3: Quantenausbeute einer Stark- und Schwachlichtkultur von Scenedesmus.

tritt kein Unterschied in der Quantenausbeute auf.

Dieses Meßergebnis stimmt mit den Aussagen von BOARDMAN et al. (1972, 1974) überein, die in der Quantenausbeute der DCPIP- Hill-Reaktion ($0,36 \mu\text{eq. DCPIP} \times \text{Einstein}^{-1}$) an SW- und ST- Chloroplasten von Atriplex patula keine Differenz feststellten.

4.3 Teilreaktion der Photosynthese

Um die photochemischen Reaktionen getrennt nach PS II- und PS I- Aktivitäten zu untersuchen, wurden Teilreaktionen an ganzen Zellen oder an photosynthetisch aktiven Partikeln gemessen.

4.3.1. PS II - Reaktionen

4.3.1.1. Hill-Reaktionen mit p-Benzochinon und DCPIP

Die Hill-Reaktion läuft unter PS II- Beteiligung ab, da H_2O als natürlicher Elektronendonator verwendet wird. Künstliche Elektronenakzeptoren nehmen hinter PS II (z.B. Benzochinon) oder hinter PS I (Ferricyanid) Elektronen auf. TREBST (1974) bezieht in die Definition einer Hill-Reaktion neben dem natürlichen Elektronendonator Wasser auch den natürlichen Elektronenakzeptor der Photosynthese, NADP^+ , mit ein. Eine derartige Definition ist nicht unumstritten, da die Hill-Reaktion ursprünglich als Sauerstoffentwicklung unter Reduzierung eines künstlichen Elektronenakzeptors angesehen wurde. In diesem Sinne soll hier der Begriff der Hill-Reaktion verwendet werden.

Für die Messung der PS II- Aktivität wurde als Hill-Reagenz p-Benzochinon eingesetzt. Nach SENGGER (1970 b) ist die Hill-Reaktion mit p-Benzochinon ausschließlich von der PS II- Aktivität abhängig. An welcher Stelle der Elektronentransportkette das Hill-Reagenz Elektronen aufnimmt, ist weitgehend unklar. Nach den Ergebnissen von FRICKEL- FAULSTICH (1974) an Chlamydomonas sind zwei oder mehr Angriffsstellen im Bereich

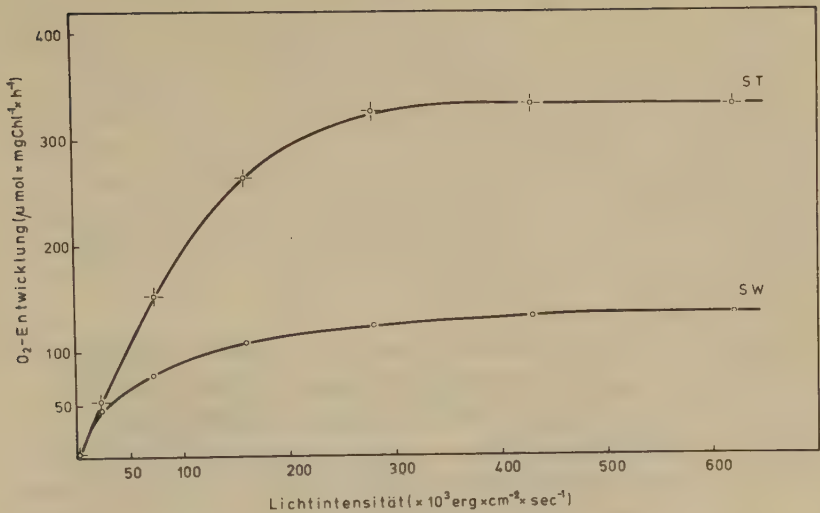


Fig. 18: Hill-Reaktion mit p-Benzochinon von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Hill-Reaktion wurde polarographisch als Sauerstoffentwicklung unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ gemessen. Zellen ($20 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. p-Benzochinon wurde 10 Minuten vor der Messung zugegeben. Die p-Benzochinonkonzentration betrug $5 \times 10^{-3} \text{ M}$.

des Plastochinonpools wahrscheinlich, da die Sauerstoffentwicklung in sehr hohem Maße, jedoch nicht vollständig, mit DBMIB gehemmt werden kann.

Die Hill-Reaktion der ST- und SW- Kulturen von Scenedesmus wurden polarographisch als Sauerstoffentwicklung gemessen. Nach 10 min Einwirkungszeit von p-Benzochinon (Endkonzentration: $5 \times 10^{-3} \text{ M}$) wurde die O₂- Entwicklung bei verschiedenen Lichtintensitäten bestimmt (Fig. 18).

Die Kurvenverläufe der PS II-Reaktionen in Abhängigkeit unterschiedlicher Bestrahlungsintensitäten ähneln denen der potentiellen Photosyntheseleistung, die als Sauerstoffentwicklung gemessen wurde.

O ₂ - Entwicklung*			
	SW	ST	ST/SW
pot. Photosyntheseleistung	270	815	3.01
Hill-Reaktion mit p.B.	115	330	2.87
Pot./Hill	2,35	2,48	

Tab. 4: Sauerstoffentwicklung (polarographisch) der pot. Photosyntheseleistung und der p-Benzo- chinon- Hill-Reaktion einer Stark- und Schwachlichtkultur von Scenedesmus. Die Algen (20 µg Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. Weitere Angaben siehe Fig. 14 und Fig. 17 *(O₂- Entwicklung in µmol x Chl⁻¹ x h⁻¹)

Die absoluten Werte der O₂- Entwicklung ganzer Zellen und der p-Bezochinon- Hill-Reaktion bei einer Bestrahlungsintensität von $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die Photosyntheseleistung, gemessen als Sauerstoffentwicklung, ist in den Starklichtkulturen etwa 3 mal so groß wie in SW- Kulturen. Der Quotient ST/SW der Hill-Reaktion beträgt 2,87. Daraus ist zu folgern, daß die Verminderung der Photosyntheseleistung der Zellen, die unter Schwachlicht anwachsen, in einer verminderten PS II- Aktivität ihre Ursache hat.

Um dieses wichtige Ergebnis der gesteigerten PS II- Reaktion der ST- Zellen zu stützen, wurde die Reduktion eines weiteren Hill-Reagenzes, DCPIP, untersucht. Da DCPIP nicht in ganze Zellen von Scenedesmus eindringen kann, war es notwendig, die Messung an zellfreien Systemen (Partikeln) durchzuführen.

Im lichtgesättigten Bereich der Hill-Reaktion reduzieren die Partikel der ST- Kulturen $415 \pm 11 \text{ µmol DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$; die Partikel der SW- Kulturen hingegen

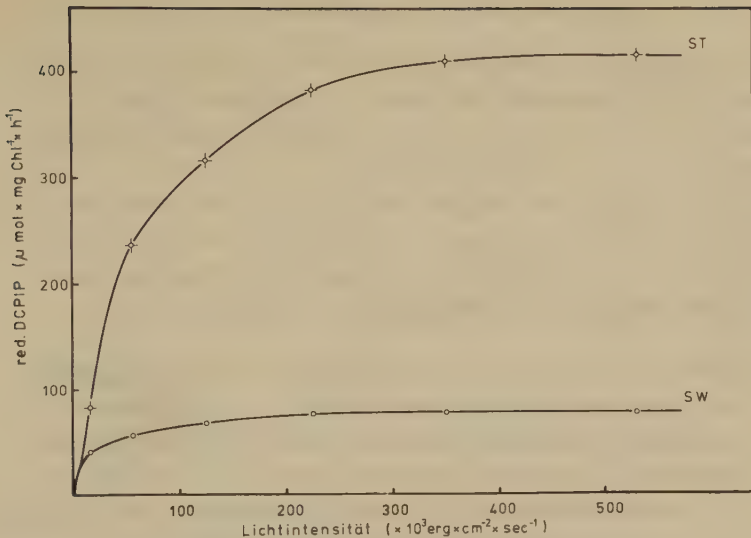


Fig. 19: Hill-Reaktion mit DCPIP an Partikeln von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Lichtintensität des Anregungslichtes (Rotlicht oberhalb 620 nm). Die Hill-Reaktion wurde spektralphotometrisch bei 578 nm als Extinktionsabnahme von DCPIP verfolgt.
Schutzfilter: Corning λ 380 - 580 nm;
IL-Filter: 578 nm.

nur $95 \pm 17 \mu\text{mol DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. Die PS II-Reaktion mit DCPIP ist in den ST- Kulturen um das 4,1 fache größer als in den SW- Kulturen.

Zwischen der PS II- Aktivität mit DCPIP als Hill-Akzeptor und der Sauerstoffentwicklung besteht ein stöchiometrisches Verhältnis von 2:1. Danach würde die O_2 - Entwicklung der Starklichtkultur in der DCPIP- Reduktion $207,5 \mu\text{mol O}_2 \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ und die der SW- Kultur $47,5 \mu\text{mol O}_2 \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ betragen. Diese Werte sind geringer als die O_2 - Entwicklung der p-Benzochinon Hill-Reaktion ganzer Zellen und weitaus geringer als die der potentiellen Photosyntheseleistung.

Der Anstieg der DCPIP- Hill-Reaktion in Abhängigkeit von der Lichtintensität weist im linearen Bereich im Vergleich beider Kulturtypen keine Unterschiede auf (Fig. 19).

Es stellt sich die Frage, wo die Ursachen für die relativ großen Differenzen der PS II- Aktivitäten der ST- und der SW- Zellen zu suchen sind. Mehrere Änderungen im Photosyntheseapparat sind denkbar:

1. Ähnlich, wie sich in synchronisierten Scenedesmus-Kulturen zu verschiedenen Entwicklungszeiten die Reoxidationsgeschwindigkeit von Plastohydrochinon verändert, wird in den Zellen unterschiedlicher Lichtanzuchtbedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Elektronentransportkette (s. Kap.1.4.1.) beeinflusst.
2. Die photochemische Reaktion $\text{Chl } a_{\text{II}} \rightarrow \text{Q}$ wird infolge der Lichtbedingungen während der Anzucht verändert.
3. Das wasserspaltende System, bzw. der direkte Elektronendonator für PS II liegt quantitativ oder strukturell verändert in beiden Kulturen vor.
4. Es verändern sich Poolgrößen der Redox-Systeme.

Zur Beantwortung der Fragen wurden Hemmstoffversuche durchgeführt. Es wurden solche Inhibitoren gewählt, von denen man weiß, daß sie an PS II oder hinter PS II den Elektronenfluß hemmen.

4.3.1.2. Hemmstoffversuche mit DCMU und DBMIB

DCMU hemmt den Elektronenfluß im Reaktionszentrum oder auf der reduzierenden Seite von Photosystem II, direkt hinter dem Quencher Q (s. Kap.1.6.).

Die prozentuale Hemmung der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit unterschiedlicher DCMU-Konzentrationen weist in homokontinuierlichen Kulturen, die unter Stark- und Schwachlichtbedingungen wachsen, den glei-

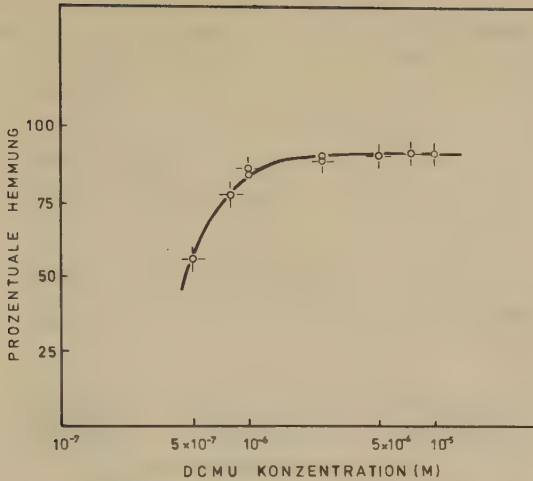


Fig. 20: Prozentuale Hemmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (polarographisch) in Abhängigkeit der DCMU-Konzentration an Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5$ erg $\times$ cm $^{-2}$ $\times$ sec $^{-1}$. Die Zellen (20 μ g Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. DCMU wurde 8 Minuten vor jeder Messung zugegeben.

chen Verlauf auf (Fig. 20). Eine maximale Hemmung von 88% wird bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ M DCMU erreicht. Eine vollständige Hemmung des Elektronenflusses von PS II nach PS I ist in ganzen Zellen homokontinuierlicher Scenedesmus- Kulturen nicht möglich.

In Scenedesmus- Kulturen konnte eine unterschiedliche DCMU- Empfindlichkeit für die einzelnen Entwicklungsstadien beobachtet werden (FRICKEL- FAULSTICH und SENGER, 1972). Danach sind Zellen, die sich im Photosyntheseminimum befinden, DCMU- unempfindlich. Man diskutiert in diesem Zusammenhang Permeationsprozesse. In den homokontinuierlichen Kulturen sind Mutterzellen, die Autosporen freisetzen (Photosyntheseminimum), vor-

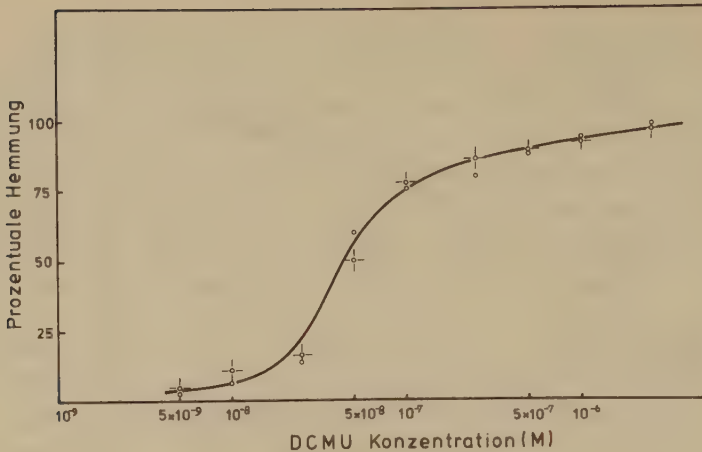


Fig. 21 : Prozentuale Hemmung der DCPIP- Hill-Reaktion an Partikeln von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus in Abhängigkeit der DCMU- Konzentration. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $2,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Meßbedingungen wie Fig. 19.

handen, die für die Abnahme der Hemmwirkung, bezogen auf die Gesamtkultur, verantwortlich sind.

Um den Effekt der verminderten DCMU-Empfindlichkeit auszuschließen, wurde die DCMU- Hemmwirkung an zell-freien Systemen untersucht. Die Hemmbarkeit der DCPIP-Hill-Reaktion photosynthetisch aktiver Partikel der Stark- und Schwachlichtkulturen in Abhängigkeit von der DCMU- Konzentration ist in Fig. 21 dargestellt. Die maximal erzielte Hemmung beträgt hier 97%. Die niedrigste DCMU-Konzentration mit dem größtmöglichen Hemmeffekt liegt bei $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$. Es wird aus Fig. 21 deutlich, daß die prozentual gleiche Hemmbarkeit des Elektronenflusses für Stark- und Schwachlichtpartikel von Scenedesmus vorliegt.

Demnach ist für die prozentuale Hemmung des Elektronenflusses die gleiche Anzahl an DCMU- Molekülen,

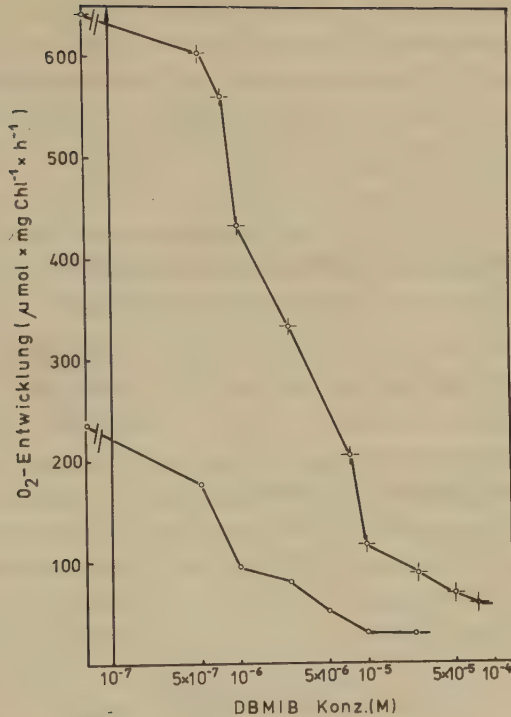


Fig. 22: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus in Abhängigkeit von der DBMIB-Konzentration. Die Zellen (20 μg Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. DBMIB wurde 10 Minuten vor jeder Messung zugegeben. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $2,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

die sich strukturell mit dem Reaktionszentrum oder dem Primärakzeptor von PS II verbinden, notwendig. Unter der Voraussetzung der strukturellen Bindung des Hemmstoffes an PS II kann man folgende Aussage treffen:

Im Verlaufe der Anpassung des Photosyntheseapparates

an unterschiedliche Lichtbedingungen während der Kultivierung verändert sich die Zahl der Reaktionszentren und der Primärakzeptoren von Photosystem II relativ zu Chlorophyll von Scenedesmus obliquus nicht.

Der Photosynthesehemmstoff DBMIB hemmt den Elektronenfluß zwischen Plastochinon und dem nachfolgenden Redox- Partner in der Elektronentransportkette. Die kompetitive Hemmwirkung von DBMIB hängt weitgehend von der Konzentration des Chinon- Derivates ab.

Die graphische Darstellung in Fig. 22 zeigt die Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen in Abhängigkeit von der DBMIB- Konzentration. Für die maximale Hemmung der Sauerstoffentwicklung sind in den SW- Kulturen weniger DBMIB-Moleküle notwendig, als in ST- Kulturen. Der größte Hemmeffekt wird in ganzen Zellen der Schwachlichtkulturen bei einer DBMIB- Konzentration von 10^{-5} M erzielt. Bei ST- Zellen ist eine 7,5-fach höhere Hemmstoffkonzentration für die maximale Hemmung notwendig.

Weiterhin tritt ein ähnlicher Effekt, wie er schon bei der DCMU- Hemmung zu beobachten war, auf. In beiden Kulturen kann DBMIB die Sauerstoffentwicklung nicht vollständig unterdrücken. Aufgrund der Permeationsschwierigkeiten übt der Hemmstoff zur 16. Std. (Photosyntheseminimum) eine geringere Hemmwirkung auf den Elektronenfluß aus als zu anderen Entwicklungszeiten. Da in den homokontinuierlichen Kulturen Entwicklungsstadien vorhanden sind, die sich im Photosyntheseminimum befinden, kann die Sauerstoffentwicklung, bezogen auf die Gesamtpopulation, nicht vollständig blockiert werden.

Um die Permeationsschwierigkeiten für den Hemmstoff zu umgehen, wurde die DBMIB- Hemmwirkung auf die DCPIP-Hill-Reaktion photosynthetisch aktiver Partikel untersucht. Die Hill- Aktivitäten der Partikel beider Kulturtypen sind mit den Unterschieden der potentiellen

Photosyntheseleistung und den Hill-Reaktionen an ganzen Zellen zu vergleichen. Die Auswirkungen verschiedener DBMIB- Konzentrationen auf die DCPIP- Hill-Reaktion sind in Fig. 23 dargestellt. Es sind mehrere Effekte der DBMIB- Zugabe auf die DCPIP- Reduktion zu beobachten:

- a) Für die maximale Hemmung der DCPIP- Hill-Reaktion werden in beiden Kulturen weniger DBMIB-Moleküle benötigt als für die entsprechende Hemmwirkung.
- b) Am wirksamsten hemmen DBMIB- Konzentrationen von 5×10^{-8} M (SW- Partikel) und 5×10^{-7} M (ST- Partikel) die Hill- Aktivitäten.
- c) Die vollständige Blockierung des Elektronenflusses ist nicht möglich. Die Rest-DCPIP- Reduktion der SW- Partikel liegt bei $32 \mu\text{mol red DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ und die der ST- Partikel bei $56 \mu\text{mol red DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.
- d) Mit zunehmenden DBMIB- Konzentrationen ist eine Steigerung der DCPIP- Reduktionsrate der SW- und der ST- Partikel zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse können folgendermaßen interpretiert werden:

- zu a) Da nach dem Aufbrechen der Zellen keine Permeationsschwellen auftreten, werden insgesamt weniger DBMIB-Moleküle als zur Hemmung der O_2 - Entwicklung ganzer Zellen benötigt, um die Hemmstelle zu besetzen.
- zu b) DBMIB hemmt den Elektronenfluß vom Plastochinonpool zum nachfolgenden Redox-Partner kompetitiv, da DBMIB mit PQH_2 um die Reoxidationsreaktion konkurriert. Da für die Hemmung der Hill- Aktivität bei ST- Partikeln höhere DBMIB- Konzentrationen eingesetzt werden müssen als bei SW- Partikeln, ist zu folgern, daß bei ST- Scenedesmus- Zellen der Plastohydrochinonpool größer ist als bei SW-

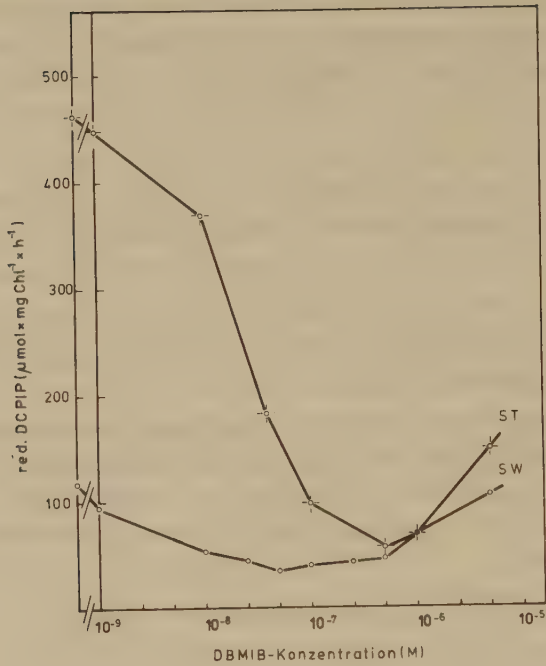


Fig. 23: DCPIP-Hill-Reaktion an Partikeln von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus in Abhängigkeit der DBMIB- Konzentration. Die Messung erfolgte im Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $2,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Meßbedingungen wie in Fig. 19.

Scenedesmus- Zellen. Eine vollständige Blockierung der Hill-Aktivität ist nicht möglich, da DCPIP in geringem Maße vor der DBMIB- Hemmstelle Elektronen aufnimmt.

- zu c) In Konzentrationen über 10^{-6} M wirkt DBMIB als Class III- Akzeptor (lipophiler Elektronenakzeptor nach der Klassifizierung der Hill- Reagenzien nach SAHA et al., 1971), der durch DCPIP im oxidierten Zustand gehalten wird. Die Reduktion des DBMIB erfolgt indirekt über die Messung der DCPIP- Reduktion.

4.3.1.3. DCPIP- Reduktion mit DPC als Elektronendonor

Nach der Inaktivierung des wasserspaltenden Systems wurde die PS II- Aktivität als DCPIP- Reduktion mit DPC als künstlichem Elektronendonor gemessen. Um das O_2 - entwickelnde System auszuschließen, wurden die Partikel in einem Wasserbad bei $48^{\circ}C$ erhitzt und in bestimmten Zeitabständen die Hill-Aktivität der hitzebehandelten Partikel bestimmt (Tab. 5).

$\mu\text{mol red.DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$		
Hitzebehandl. (min)	SW	ST
o	102	424
10	8	132
20	2	48
30	-	11

Tab. 5: Hill-Aktivitäten hitzebehandelter Partikel gemessen als DCPIP- Reduktion. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 630 nm) von $2,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Weitere Bedingungen wie Fig. 18.

Hitzebehand- lung (min)	H ₂ O-→ DCPIP	DPC -→ DCPIP	DPC→DCPIP + DCMU	DPC-→ DCPIP korrig.
0	91,1	-	-	-
SW 10	5	94,5	44,1	50,4
30	-	-	-	-
0	406,0	-	-	-
ST 10	121,8	251,7	49,6	202,1
30	14,5	108,8	53,3	55,5

Tab. 6: PS II- Aktivität von ST- und SW- Partikeln gemessen als DCPIP- Reduktion mit DPC als künstlichem Elektronendonator. DCPIP war in einer Konzentration von 4×10^{-5} M in die Reaktion eingesetzt. Die DPC- Konzentration betrug 5×10^{-4} M pro Reaktionsansatz. Die red. DCPIP- Werte sind pro mg Chl pro h berechnet. Die DCMU- Konzentration betrug 10^{-6} M.

Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 630 nm) von $2,5 \times 10^5$ erg $\times$ cm⁻² $\times$ sec⁻¹.

Weitere Bedingungen wie Fig. 18

Die Hitzebehandlung der Partikel führt über die Freisetzung von Mn- Ionen aus dem Enzymkomplex zur Inaktivierung der Wasserspaltung (KATOH et al., 1971; CHENIAE und MARTIN, 1971). Geht man von der Voraussetzung aus, daß die mechanische Schädigung des O₂-entwickelnden Systems beim Aufschlagen der Zellen für SW- und ST- Zellen gleich groß ist, so zeigen die Werte von Tab. 5, daß Veränderungen auf der oxidierenden Seite von PS II in den Zellen, die unter Starklicht wachsen, auftreten. Die Hill- Aktivität der SW- Partikel ist nach 10 min Erwärmung bei 48°C nahezu vollständig blockiert, während die Aktivität der ST- Partikel nur um 75% vermindert ist.

Die Veränderungen, die in den ST- Zellen auftreten, beruhen entweder auf einer verstärkten lichtabhängigen Mn- Einlagerung in den Enzymkomplex, oder auf einem strukturell bedingten Aneinanderrücken der Reaktionspartner.

Die korrigierten Werte der DCPIP- Reduktion mit DPC als Elektronendonator sind nach der Inaktivierung des wasserspaltenden Systems gleich (Tab. 6).

Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den PS II- Aktivitätsmessungen von WILD et al. (1973) überein, die in D_1 - Fraktionen von Sinapis eine 4 mal höhere PS II- Aktivität der ST- Partikel gegenüber SW- Partikeln bestimmen. Allerdings kann man dem Artikel nicht entnehmen, in welchem Umfang das O_2 - entwickelnde System als natürlicher Donor inaktiviert war. Aus Tab. 6 geht deutlich hervor, daß nach 10 min Erwärmen auf 48°C das wasserspaltende System in den ST- Partikel neben DPC noch als natürlicher Elektronendonor wirksam ist.

Insgesamt ergibt sich für den Vergleich der Reaktionen um PS II von Scenedesmus- Kulturen, die unter Stark- und Schwachlichtbedingungen wachsen, folgendes Bild:

- a) Unter Starklichteinfluß sind Veränderungen auf der oxidierenden Seite von PS II festzustellen.
- b) Da die prozentuale Hemmung der PS II- Reaktionen mit DCMU unverändert ist und die DPC $\rightarrow$ DCPIP- Reaktion gleiche PS II- Aktivitäten aufweist, wird angenommen, daß sich die Zahl der Reaktionszentren und der primären Akzeptoren von Photosystem II relativ zu Chlorophyll nicht unterscheidet.
- c) Die unterschiedliche Hemmung des Elektronenflusses von PS II nach PS I mit DBMIB als Inhibitor deutet auf einen stärker reduzierten Plastochinonpool in den ST- Zellen hin. Dieses Ergebnis wird durch Abklingkinetiken der Cyt f Oxidation bestätigt (Kap. 4.5.2.)

Aufgrund der Hemmstoffversuche kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob der stärker reduzierte Pool nur durch die Überführung von PQ zu PQH₂ entsteht, oder ob es daneben zu einer Neusynthese von PQ und PQH₂ kommt.

4.4. PS I- Reaktionen

Die photochemischen Aktivitäten von Photosystem I der SW- und ST- Kulturen wurden mit Hilfe mehrerer Methoden bestimmt.

Die Reduktion von CO₂ mit molekularem Wasserstoff als Elektronendonator ist unter Ausschaltung von PS II eine Teilreaktion der Photosynthese, die man im licht-limitierenden Bereich der Wirkung von Photosystem I zuschreibt. Die Photoreduktion, gemessen als CO₂-Aufnahme in Abhängigkeit von der Lichtintensität der ST- und SW-Zellen, ist in Fig. 24 wiedergegeben. Problematisch für den Vergleich der PSI - Aktivität beider Kulturtypen ist die Beurteilung des Kurvenverlaufes der CO₂- Reduktion der ST- Kultur. Der Anstieg der ST- Kurve weist zu Beginn der Reaktion keine Linearität auf. Erst mit zunehmenden Lichtintensitäten ist im Vergleich zur SW- Kurve ein stärkerer Anstieg der CO₂- Fixierung zu verzeichnen. Die Lichtsättigung der Reaktion erfolgt in den ST- Zellen bei höheren Lichtintensitäten als in den SW- Zellen.

Folgende Interpretationen sind für die Diskussion der CO₂- Fixierung mit molekularem Wasserstoff als Elektronendonator möglich. Danach ist entweder die Quantenausbeute der Photoreduktion der SW- und ST- Kulturen nicht gleich, oder es findet in den ST- Zellen bei niedrigen Lichtintensitäten ein zyklischer Elektronentransport um PS I statt. Erst mit zunehmender Beleuchtungsintensität werden Elektronen für die CO₂-Reduktion bereitgestellt. Daß ein zyklischer Elektronenfluß unter anaeroben Bedingungen in Scenedesmus

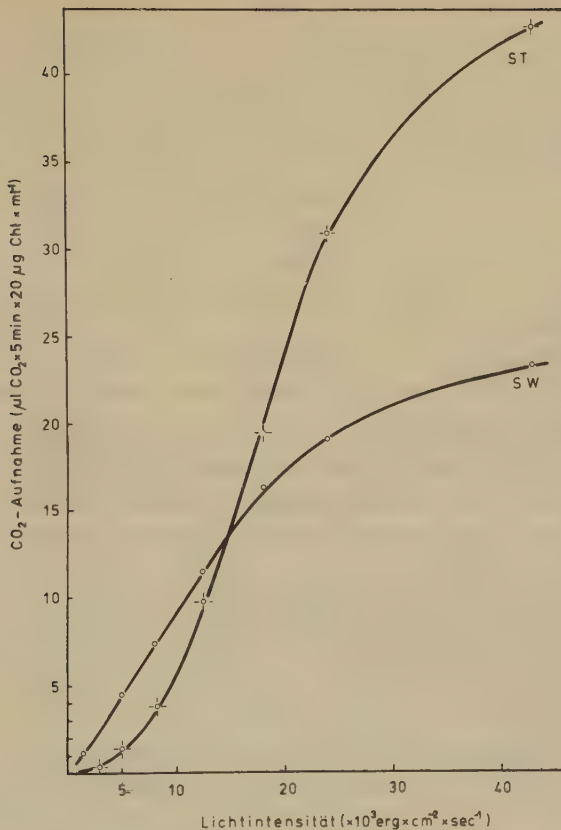


Fig. 24: Photoreduktion als CO_2 - Aufnahme (manometrisch) in Abhängigkeit von der Lichtintensität (Rotlicht oberhalb 620 nm) von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus. DCMU- Konzentration 1×10^5 M.

abläuft, dürfte aufgrund von ATP-Messungen gesichert sein (SCHÄFER, 1975). Die Frage, inwieweit ein zyklischer Elektronentransport bei niedrigen Lichtintensitäten für die verminderte CO_2 - Reduktion verantwortlich ist, wurde nicht untersucht, doch sollten DBMIB-Hemmstoffversuche darüber Auskunft geben.

In weiteren Versuchen wurde die PS I- Aktivität als Sauerstoffaufnahme von Methylviologen (MV) mit reduziertem DCPIP und reduziertem DAD als Elektronendonoren

S a u e r s t o f f a u f n a h m e

Experiment	SW	ST
1	334,5	834,5
2	380,3	902,5
3	316	762,5
Mittelwert mit Standardabweich.	343,5 $\pm$ 33	858 $\pm$ 109,3

Tab. 7: Photosystem I- Reaktion aus Partikeln von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die PS-I- Aktivität wurde polarographisch als Sauerstoffaufnahme während der Photoreduktion von MV unter Rotlicht (oberhalb 620nm) gemessen. Die Lichtintensität des Anregungslichtes betrug $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Endkonzentrationen des Reaktionsgemisches betragen: Asc. : 5 mM; DCMU: 2 μM ; MV: 1 mM; DCPIP: 0,1 mM. Die Partikel waren in Phosphatpuffer (pH 6,5; 0,05 M) suspendiert. Die Werte der Sauerstoffaufnahme sind als $\mu\text{mol O}_2 \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ wiedergegeben.

bestimmt. Die Reduktion von DCPIP und DAD erfolgte mit Ascorbat, das selbst keine Elektronen an Redox- Überträger der Elektronentransportkette abzugeben vermag (TREBST, 1974). Die Stellen, wo die Elektronen der Donorsysteme in die Elektronentransportkette einfließen, werden nicht einheitlich beurteilt (siehe Kap. 1.6.)

Aus den Mittelwerten der Tab. 7 ergibt sich, daß die PS I- Reaktion mit DCPIP als Elektronendonator der ST-Partikel um das 2,5-fache größer ist als die der SW-Partikel.

Die PS I- Aktivität der ST- und der SW-Partikel, gemessen als Sauerstoffaufnahme von MV in Abhängigkeit von der DAD- Konzentration ist in Fig. 25 dargestellt. Aus der Graphik wird ersichtlich, daß für die Sätti-

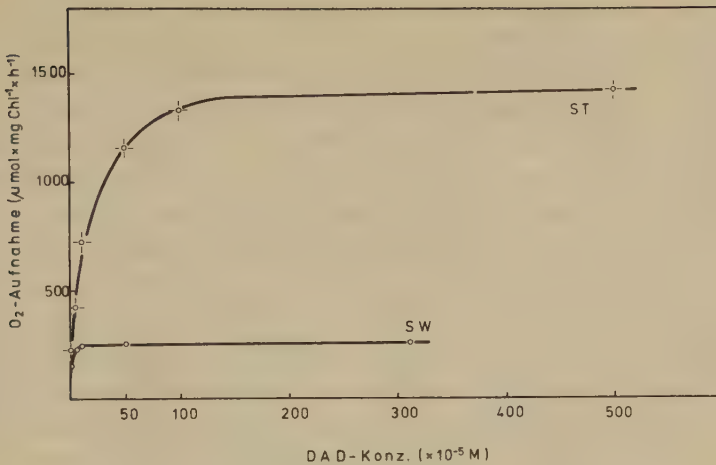


Fig. 25: Photosystem I- Aktivität an Partikeln von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus. Die Aktivität wurde polarographisch als Sauerstoffaufnahme durch MV in Abhängigkeit der DAD- Konzentration gemessen. Die Messung erfolgte unter Rotlicht (oberhalb 620 nm) von $6,25 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Weitere Meßbedingungen mit Ausnahme von DCPIP wie in Tab. 6

gung der PS I-Reaktion der SW- Partikel eine DAD-Konzentration von $5 \times 10^5 \text{ M}$ ausreichend ist. Die Sättigung der PS I- Reaktion der ST- Partikel erfolgt bei einer zehnmal höheren DAD- Konzentration. Im Vergleich der PS I- Reaktion mit DCPIP und DAD als Elektronendonoren untereinander, ist die Sauerstoffaufnahme von MV in der DAD- Reaktion effektiver als in der DCPIP- Reaktion.

Da die Elektronen von den Donoren nicht direkt an das Reaktionszentrum von PS I abgegeben werden, sondern von Redox-Überträgern der Elektronentransportkette aufgenommen werden, ist für die Diskussion der PS I-Reaktion der Partikel die Konzentration der Intermediate pro Chlorophyll von Bedeutung. Um das PS I- Zentrum

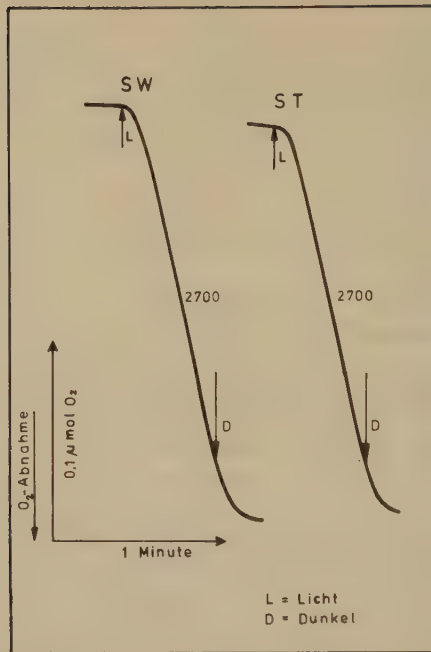


Fig. 26: Photosystem I- Aktivität an DT₃₀- Subpartikeln (10 μg Chlorophyll/ml) von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus. Die Aktivität wurde polarographisch als Sauerstoffaufnahme durch Methylviologen gemessen. Die Konzentration von Triton X-100 betrug 0,1 %. Die Werte der Sauerstoffaufnahme sind in μmol O₂ x mg Chl⁻¹ x h⁻¹ angegeben. Weitere Bedingungen siehe Tab. 6.

dem Elektronendonator direkt zugänglich zu machen, wurden die Partikel mit hohen Triton X-100- Konzentrationen (0,1%) behandelt. Nach Vorstellungen von MURATA und FORK (1971) wird durch Triton der Elektronentransport zwischen dem natürlichen Elektronendonator für PS I und dem Reaktionszentrum blockiert. Triton X-100- Konzentrationen über 0,03% führen darüberhinaus zu Änderungen der Thylakoidmembran. Es wird davon ausgegangen, daß Triton X-100 Behandlung das

PS I- Reaktionszentrum für reduziertes DCPIP direkt zugänglich macht. Tatsächlich sind höhere Raten für die Sauerstoffaufnahme meßbar (Fig. 26).

Die Photoreduktion von MV, gemessen als Sauerstoffaufnahme zeigt, daß die PS I-Reaktionen der Stark- und Schwachlichtsubpartikel gleich ist. Die Sauerstoffaufnahme von MV beträgt jeweils $2700 \mu\text{mol} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Damit ist gezeigt, daß die veränderte PS I- Aktivität der Partikel von ST- und SW- Zellen auf unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse der Redox-Überträger, die Elektronen von den künstlichen Donoren aufnehmen, zurückzuführen ist.

Es wird aus den oben beschriebenen Versuchen deutlich, daß für die Photoreduktion von MV keine Plastocyaninzugaben notwendig sind. Da die PS I- Reaktion $\text{Asc./DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ der photosynthetisch aktiven Partikel Unterschiede gleichen Ausmaßes aufweist wie der Cyt f- Gehalt der SW- und ST- Zellen, wird vermutlich Cyt f als Reaktionspartner für DCPIP und DAD anzusehen sein.

Es wird zu untersuchen sein, war aber nicht Aufgabe dieser Arbeit, in welchem Umfang Plastocyanin durch das Aufbrechen der Zellen aus der Thylakoidmembran herausgelöst wird. Zugaben von Plastocyanin zum Reaktionsgemisch $\text{Asc./DCPIP} \rightarrow \text{MV}$ zeigten keinen stimulierenden, eher hemmenden Effekt auf die Sauerstoffaufnahme durch MV. Dies ist ein zusätzliches Indiz dafür, daß die Elektronen von reduziertem DCPIP und reduziertem DAD nicht über Plastocyanin zum Reaktionszentrum von PS I übertragen werden

4.5. Die Elektronentransportkette

4.5.1. Poolgrößen der Redox- Überträger

Die potentielle Photosyntheseleistung der SW- Kultur, die als Sauerstoffentwicklung pro Chlorophyll bestimmt

wurde, ist um etwa 65% geringer als die der ST- Kulturen. Da es sich gezeigt hat, daß die photochemischen Aktivitäten von PS II beider Kulturtypen gleichartige Unterschiede aufweisen, war es notwendig, quantitative Untersuchungen des relativen Gehaltes der Redox- Überträger durchzuführen.

Die Bestimmung von P_{700} /Chl. erfolgte in einem chemisch induzierten Differenzspektrum (oxidiert - reduziert) in Subpartikeln von Scenedesmus. Der Chlorophyllgehalt der DT_{30} - Partikel betrug in den ST- Partikeln 15,9% und in den SW- Subpartikeln 18,3% des ursprünglich eingesetzten Chlorophyllgehaltes. Das molare Verhältnis Chlorophyll/ P_{700} betrug in den SW- Subpartikeln : $Chl/P_{700} = 197 \pm 5$ und in den ST- Subpartikeln: $Chl/P_{700} = 211 \pm 10$.

Den Zahlen ist zu entnehmen, daß das molare Verhältnis von Chl/P_{700} in Scenedesmus- Zellen, die unter verschiedenen Lichtbedingungen wachsen, keine nennenswerte Differenz aufweist.

Während das molare Verhältnis Chl/P_{700} in beiden Kulturen relativ konstant bleibt, wird der Gehalt der Cytochrome bezogen auf Chlorophyll unter den gewählten Lichtbedingungen in den Dauerlichtkulturen stark verändert (Tab.8). Die Bestimmung der Cytochromgehalte erfolgte mittels chemisch induzierter Differenzspektren.

Cytochrom	SW	ST	SW als % von ST
Cyt f	$1,31 \pm 0,05$	$3,32 \pm 0,07$	39,5
Cyt b_{563}	$1,56 \pm 0,11$	$3,03 \pm 0,07$	51,5
Cyt b_{559} LP	$1,34 \pm 0,07$	$3,87 \pm 0,13$	34,6
Cyt b_{559} HP	$2,81 \pm 0,12$	$3,94 \pm 0,11$	71,3

Tab.8: Cytochromgehalte in $10^{-3} \mu M/mg$ Chlorophyll von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus obliquus.

Der Cyt f- Gehalt,bezogen auf Chlorophyll der Schwachlichtkultur,liegt um etwa 60% niedriger als der Cyt f- Gehalt der ST- Kultur. Ein ähnlicher Wert ergibt sich für Cyt b_{559} LP (65%). Die Abnahmen der Cyt f und Cyt b_{559} LP- Werte pro Chlorophyll der SW- Kultur gegenüber den Werten der ST- Kultur korrelieren mit der verminderten Photosyntheseleistung der SW- Kultur.

Außerdem deutet die gleichartige Änderung des Cyt b_{559} LP- Gehaltes darauf hin, daß zwischen beiden Poolgrößen ein Zusammenhang besteht. Wahrscheinlich ist Cyt b_{559} LP wie Cyt f in der nicht-zyklischen Elektronentransportkette angeordnet. Nach Untersuchungen von BISHOP (1973) an Mutanten von Scenedesmus ist Cyt b_{559} LP am nicht-zyklischen Elektronentransport beteiligt.

Der Gehalt an Cyt b_{563} /Chl nimmt in den Zellen, die unter Starklichtbedingungen wachsen, um das 1,9-fache zu. Im allgemeinen wird heute die Teilnahme dieses Cytochroms am zyklischen Elektronentransport als erwiesen angesehen (s. Kap.1.4.2). Demnach wäre eine größere Kapazität des zyklischen Elektronentransportes in den ST- Zellen im Vergleich zu den SW- Zellen anzunehmen, der aber nicht im gleichen Umfang zunimmt wie der nicht-zyklische. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß in SW- Zellen ein höherer Anteil des zyklischen Elektronentransportes am Gesamtelektronentransport beteiligt ist als in den ST- Zellen. Diese Vorstellungen gehen mit der Interpretation von WILD et al. (1973) konform, die aus dem relativen Cyt f / P_{700} - Verhältnis beider Kulturtypen auf eine ähnliche Regulierung des Elektronentransportes schließen. Da der Plastochinonpool in den ST- Zellen im reduzierten Zustand vorliegt, würde damit das Modell von HEBER (1969) nachhaltig gestützt werden, das mit zunehmender Reduzierung des Einmündungsortes eine Verminderung des zyklischen Elektronentransportes beschreibt.

Cyt b_{559} HP spielt eine besondere Rolle in der Änderung der PS II- Aktivität (Kap.1.4.1.) Inwieweit die High Potential - Form von Cyt b_{559} , die in den Zellen der

Starklichtkultur um das 1,5-fache zunimmt, in einer Art Rückkopplung des Elektronentransportes die oxidierende Seite von Photosystem II der ST- Zellen stärker beeinflusst als die der SW- Zellen, kann nur vermutet werden. Ein verstärkter zyklischer Elektronenfluß um PS II ist aber nicht auszuschließen, insbesondere, da auch die MP- Form von Cyt b_{559} pro Chlorophyll in den ST- Kulturen erhöht ist. Ein Vergleich der A - HQ- Spektren veranschaulicht das Verhältnis der Poolgrößen von Cyt b_{559} MP/Chl der SW- und der ST-Kultur (Fig. 27).

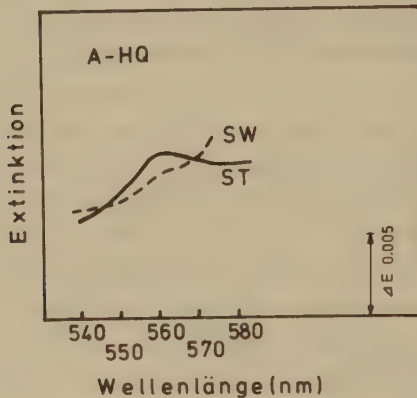


Fig. 27: Typisches A - HQ Cytochrom- Differenzspektrum von Stark- und Schwachlichtpartikeln von Scenedesmus.

(A = Ascorbat; HQ = Hydrochinon)

Meßbedingungen wie in Kap. 3.11.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergrünungsexperimente von INOUE et al. (1974). Sie fanden an ergrünenden Weizenkeimlingen, daß die Aktivierung des wasserspaltenden Systems mit dem Elektronentransport von PS II nach PS I gekoppelt ist. Die Ergebnisse weiterer Versuche, die eine Rückkopplung zwischen der

Elektronentransportkette und der oxidierenden Seite von PS II vermuten lassen, sind im allgemeinen Teil der Einleitung ausführlich behandelt worden (Kap.1.4.1.).

Cytochrom	SW	ST
Cyt f	848	334
Cyt b ₅₆₃	712	366
Cyt b ₅₅₉ LP	829	287
Cyt b ₅₅₉ HP	395	281

Tab. 9 : Molares Chlorophyll/Cytochromverhältnis von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus obliquus.

In Tab. 9 sind die molaren Chlorophyll/Cytochromverhältnisse wiedergegeben. Es geht daraus hervor, daß das Verhältnis der Chlorophyllmoleküle, die auf ein Cytochrommolekül kommen, im Vergleich beider Kulturen große Schwankungen aufweist. Fungiert Cyt f im nicht-zyklischen Elektronentransport, so beträgt die Anzahl der Chlorophyllmoleküle pro Elektronentransport in den ST- Scenedesmus- Zellen 330 und in den SW- Zellen 850. Ähnliche Relationen werden auch von Höheren Pflanzen berichtet (BOARDMAN et al.(1972; 1974; WILD et al., 1973; GRAHL und WILD, 1972).

Konstanz oder Änderung der Photosyntheseeinheit wird in Kap. 5 ausführlich diskutiert.

4.5.2. Lichtinduzierte Cyt f - Oxidationen

Die lichtinduzierten Absorptionsänderungen von Cyt f wurden an ganzen Zellen und an Partikeln bei 554 nm gegen 540 nm in einem Aminco- Chance DW-W -Spektral-photometer im "Dual-Wavelength"- Verfahren gemessen. Das Ausmaß der Cyt f- Oxidation soll nicht als Bestimmungskriterium für den Gehalt an Cyt f in ganzen Zellen gewertet werden, da es als unwahrscheinlich gilt, daß der Oxidations-Reduktionszustand von Cyt f in

Stark- und Schwachlichtkulturen gleich ist. Vielmehr sollen die Kinetiken der Photooxidation von Cyt f und die Abklingkinetiken nach dem Ausschalten des Anregungslichtes unter dem Gesichtspunkt der Geschwindigkeit des Elektronentransportes von PS II nach PS I betrachtet werden.

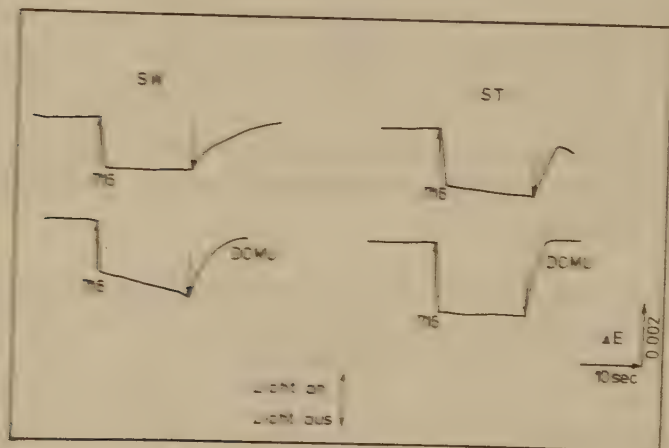


Fig. 28: Cyt f- Oxidation in ganzen Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von *Scenedesmus*. Algenzellen (20 µg Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. Die Zellen wurden mit monochromatischem Licht von 716 nm bestrahlt. Die Intensität des Anregungslichtes betrug $2,1 \times 10^4 \text{ erg cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$; Meßwellenlänge 554 nm; Referenzwellenlänge 540 nm. Schutzfilter : Corning 380-580nm.

Das Ausmaß der Photooxidation von Cyt f ist in den SW- Zellen unter monochromatischem Licht von 716 nm, das PS I anregt, nur geringfügig kleiner als das der ST- Zellen (Fig. 28). Für dieses Ergebnis sind zwei Interpretationen möglich. Entweder liegt Cyt f

in den Zellen bereits in einem oxidierten Zustand vor, oder es ist die Lichtintensität des Anregungslichtes für die Photooxidation nicht sättigend. In vivo-Messungen der Cyt f- Oxidation an licht- und dunkeladaptierten Ulva- Zellen haben deutlich gemacht, daß licht-adaptierte Algen höhere Anregungsintensitäten zur vollständigen Oxidation benötigen als dunkeladaptierte (TROUGHTON und FORK, 1974).

Nach dem Ausschalten des Anregungslichtes erfolgt die Rereduzierung von Cyt f. Aus dem Vergleich der Abklingkinetiken beider Kurven geht hervor, daß dieser Vorgang in den ST- Zellen wesentlich schneller abläuft als in den SW- Zellen. DCMU hat keinen Einfluß auf die Rereduzierung von Cyt f. Folglich wird Cyt f direkt oder indirekt von einem reduziert vorliegenden Pool rereduziert. Damit bestätigt sich das Ergebnis, daß der Plastohydrochinonpool in den ST- Zellen größer ist und zu einem beschleunigten Elektronentransport führt.

Die Photooxidation von Cyt f der Schwach- und Starklichtzellen nach Anregung mit monochromatischem Licht von 640 nm ist in Fig. 29 dargestellt. Die Lichtintensität des Anregungslichtes betrug $4,2 \times 10^4 \text{ erg cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ und war damit doppelt so groß wie die des 716 nm- Lichtes.

Nach den Vorstellungen von GOVINDJEE (1971) verfügen beide Photosysteme über eine annähernd gleiche Pigmentzusammensetzung (Fig. 1). Demzufolge sollte monochromatisches Licht von 640 nm Wellenlänge beide Photosysteme anregen und einen Elektronentransport von PS II nach PS I ermöglichen.

Den Kurven in Fig. 29 kann man entnehmen, daß das Ausmaß der Photooxidation von Cyt f der SW- Zellen größer ist als das der ST- Zellen. Aus dem Kurvenverlauf während der Belichtung geht hervor, daß die Rereduzierung von Cyt f in den ST- Zellen schneller vonstatten geht als in den SW- Zellen. Da im Vergleich beider

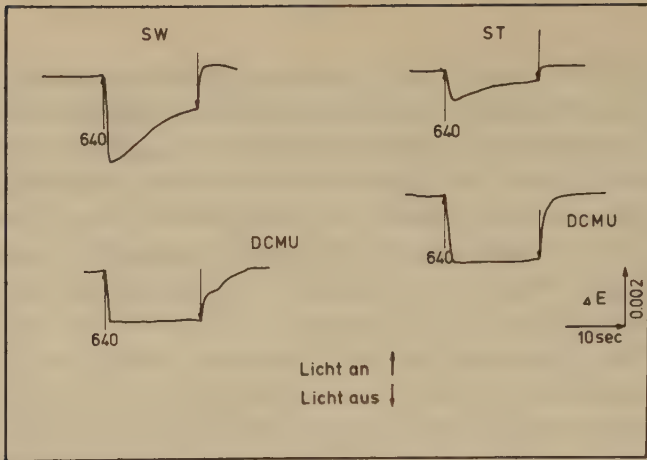


Fig. 29: Cyt f- Oxidation in ganzen Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von *Scenedesmus*. Algenzellen ($20 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer ($0,05 \text{ M}$; $\text{ph } 7,0$) suspendiert. Die Zellen wurden mit monochromatischem Licht von 640 nm bestrahlt. Die Intensität des Anregungslichtes betrug $4,2 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die DCMU- Konzentration betrug $5 \times 10^{-6} \text{ M}$.
 Meßwellenlänge: 554 nm ; Referenzwellenlänge: 540 nm ; Schutzfilter Corning: $\lambda 380 - 580 \text{ nm}$.

Kulturtypen der reduzierte PQ-Pool der ST- Zellen rasch Elektronen abgeben kann, wird die Geschwindigkeit des Elektronentransportes von PS II nach PS I entscheidend von dem Reduktionszustand von Plastochinon beeinflusst.

Hemmt man den Elektronenfluß mit DCMU, so nimmt das Ausmaß der Photooxidation von Cyt f der SW- Zellen ab, das der ST- Zellen hingegen zu.

Da der Elektronenfluß hinter PS II blockiert ist, erfolgt keine Reduzierung von Cyt f in den ST- Zellen. Cyt f bleibt während der Belichtung im oxidierten Zustand.

Führt man die Photooxidation von Cyt f an Partikeln der SW- und ST- Zellen mit monochromatischem Anre-

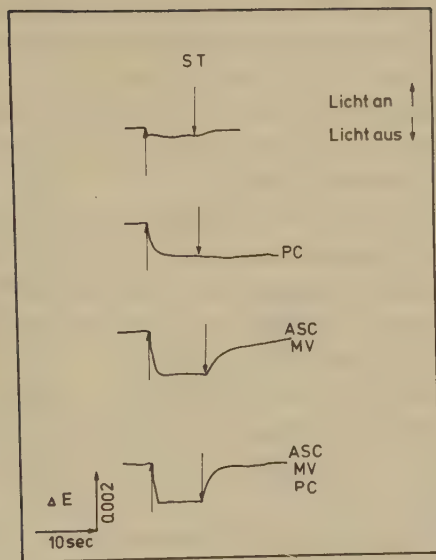


Fig. 30: Cytochrom f- Oxidation an Partikeln von Starklichtkulturen von Scenedesmus-Zellen ($42 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) waren in Phosphatpuffer ($0,05 \text{ M}$; $\text{pH } 7,0$) aufgenommen worden. Die Bestrahlung erfolgte mit monochromatischem Licht von 716 nm . Die Lichtintensität des Anregungslichtes betrug $2,1 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

Die Endkonzentrationen der zugesetzten Substanzen betragen : Ascorbat: $1 \times 10^{-3} \text{ M}$;
MV: $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; PC: $0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Meßwellenlänge: 554 nm ; Referenzwellenlänge: 540 nm ; Schutzfilter: Corning $\lambda 380 \text{ nm} - 580 \text{ nm}$.

gungslicht von 716 nm durch, so ist zu Beginn des Versuches eine künstliche Reduzierung des Cytochroms notwendig. In Fig. 30 sind die verschiedenen Kurvenverläufe der Cyt f- Oxidation der ST- Partikel nach Behandlung dargestellt.

Zellfreie, photosynthetisch aktive Partikel weisen ohne Zusätze keine Absorptionsänderungen auf. Da Cyt f entweder im oxidierten Zustand vorliegt, oder aber der Elektronenfluß zwischen Cytochrom f und P_{700} durch das Herauslösen von Plastocyanin beim Aufbruch der Zellen unterbrochen wurde.

Reduziert man Cyt f mit Ascorbat und gibt einen zusätzlichen Elektronenakzeptor hinzu (MV), so kann Cyt f durch PS I- Licht langsam oxidiert werden. Eine Zunahme der Absorptionsänderung nach Plastocyaninzugabe konnte nicht beobachtet werden.

Setzt man unbehandelten Partikeln PC hinzu, so erfolgt eine langsame Oxidation von Cyt f. Nach dem Ausschalten des Anregungslichtes unterbleibt die Rereduzierung von Cyt f.

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist außerordentlich schwierig. Es erscheint wahrscheinlich, daß Plastocyanin zwischen Plastochinon und Cyt f lokalisiert ist. Folgende Gründe sprechen für diese Annahme:

- a) Reduziert man Cyt f künstlich, so wird das Cytochrom von PS I oxidiert.
- b) Setzt man PC hinzu, so können Elektronen aus dem PQ-Pool über PC Cyt f teilweise reduzieren, so daß bei Belichtung eine Oxidation möglich ist. Eine Rereduzierung findet nicht statt, da der PQ- Pool durch die fehlende PS II- Aktivität weitgehend oxidiert worden ist.
- c) In Zusammenhang mit der MV-Photoreduktion mit DCPIP als künstlichem Elektronendonator scheint es wahrscheinlich, daß Cyt f unmittelbar mit dem Reaktionszentrum von PS I verbunden ist.

Die Photooxidation von Cyt f der SW- Partikel nach Behandlung mit den oben beschriebenen Substanzen zeigt generell die gleichen Charakteristiken; lediglich das Ausmaß der Absorptionsänderungen ist geringer.

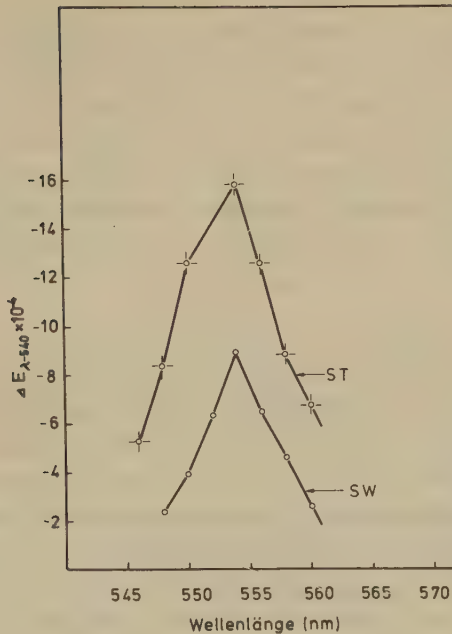


Fig. 31: Lichtinduzierte Differenzspektren an Partikeln von Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus. Die Partikel, eingestellt auf $45 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml, waren in Phosphatpuffer ($0,05 \text{ M}$; $\text{pH } 7,0$) aufgenommen worden. Die Bestrahlung erfolgte mit monochromatischem Licht von 716 nm . Die Intensität des Anregungslichtes betrug $2,1 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Substanzen betrugen: Ascorbat : $1 \times 10^{-3} \text{ M}$; MV: $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; Referenzwellenlänge : 540 nm ; Schutzfilter : Corning: λ 380 - 580 nm.

Die Differenzspektren für die lichtinduzierten Absorptionsänderungen der SW- und ST- Partikel sind in Fig. 31 dargestellt. Den Partikeln sind Ascorbat und MV zugesetzt worden.

Das Maximum des Differenzspektrums liegt bei 554 nm und ist mit der $\mathcal{L}$ -Bande von Cyt f identisch. Die Absorptionsänderung von Cyt f bezogen auf Chlorophyll der behandelten ST- Partikel ist etwa doppelt so groß wie die der SW- Partikel. Das Verhältnis ST/SW der lichtinduzierten Cyt f- Oxidation fällt damit niedriger aus als das der chemisch induzierten Differenzspektren.

4.6. Absorptionsänderungen bei 520 nm

Die Bestrahlung von Scenedesmus- Zellen mit Rotlicht (oberhalb 620 nm) ruft bei einer Wellenlänge von 520nm geringe Absorptionsänderungen hervor. Nach der Belichtung mit dem Anregungslicht tritt am Wildstamm von Scenedesmus ein biphasisches Signal auf (PRATT und BISHOP, 1968).

Die Messung der Absorptionsänderung erfolgte durch seitliches Bestrahlen der Proben in einem Aminco-Chance DW-2 Spektralphotometer. Ganze Zellen (10 μ g Chl/ml) waren in Phosphatpuffer (pH 7,0; 0,05 M) suspendiert und wurden vor jeder Messung geschüttelt, um eine Sedimentation der Zellen zu vermeiden.

Die erste schnelle Phase steigt rasch an und ist im Vergleich beider Kulturtypen im Kurvenverlauf der SW-Zellen höher als in den ST- Zellen (Fig. 32). Der erste Teil der Absorptionsänderung wird entweder auf die Wirkung von Photosystem I (PRATT und BISHOP, 1968) oder auf die Wirkung von Photosystem I und Photosystem II (JOLIOT und JOLIOT, 1974) zurückgeführt.

Die zweite Phase der Absorptionsänderung geht bei der Messung an den SW- Zellen unmittelbar aus der ersten Phase hervor, während im Kurvenverlauf der ST- Zellen generell eine Depression nach 100 ms erkennbar wird.

Die Ausbildung des zweiten Teiles des Signals ist von der PS II- Aktivität, dem Ausmaß des Elektronenflusses von PS II nach PS I abhängig (LARKUM und BONNER,

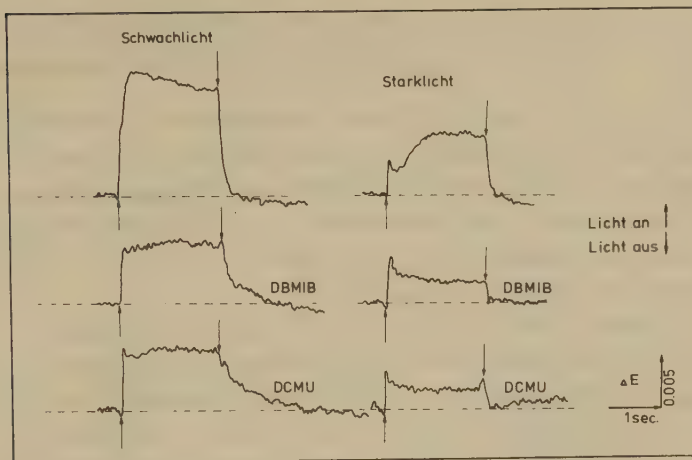


Fig. 32: Lichtinduzierte Absorptionsänderungen bei 520 nm in Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Intensität des Anregungslichtes (Rotlicht oberhalb 620 nm) betrug $2,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Zellen ($20 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ ml) waren in Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,0) suspendiert. DBMIB- Konzentration : 1×10^{-5} M; DCMU- Konzentration: 5×10^{-6} M. Schutzfilter: Corning: λ 380 - 580 nm.

1972). Verläuft der Elektronenfluß langsam, so erscheint ein hohes Signal; umgekehrt korrelieren geringe Absorptionsänderungen der zweiten Phase mit einem schnellen Elektronentransport. Unter diesem Gesichtspunkt sollen die registrierten Verläufe der Absorptionsänderungen interpretiert werden.

Die Ausprägung des zweiten Teils des Signals war an Starklichtzellen in der Absorptionshöhe immer niedriger als an Schwachlichtzellen.

Hemmt man den Elektronenfluß von PS II nach PS I mit DBMIB oder mit DCMU, so wird die zweite Phase der Absorptionsänderung unterdrückt.

4.7. Lichtinduzierte Konformationsänderungen an Stark- und Schwachlichtzellen von Scenedesmus

Bei der Bestrahlung mit photosynthetisch wirksamem Licht zeigt die einzellige Grünalge Scenedesmus Struktur- und Volumenänderungen des Chloroplasten. Die lichtabhängige Schrumpfung des Chloroplasten kann spektralphotometrisch nach dem Streulichtmeßverfahren registriert werden.

Nach HEBER (1969) besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungspotential ($\text{ATP/ADP} + \text{P}_i$), dem Energiezustand der Thylakoidmembran und der Chloroplastenschrumpfung. Danach kann eine starke Schrumpfung des Chloroplasten - angezeigt durch die Extinktionszunahme - als Parameter für ein hohes Phosphorylierungspotential gewertet werden.

In Fig. 33 sind die typischen Signale an Stark- und Schwachlichtzellen, die bei der Anregung mit Rotlicht (oberhalb 620 nm) auftreten, dargestellt.

Sofort nach Strahlungsbeginn ist eine schnelle Extinktionsänderung zu verzeichnen, die im Kurvenverlauf der SW- Zellen nach einer kurzen Verzögerungsphase von einem geringen zweiten Anstieg abgelöst wird. Die zweite Phase der Änderungen ist bei den SW- Zellen mit einer erneuten Extinktionsabnahme verbunden. Die Kurve sinkt nach Bestrahlungsende unter den Ausgangswert. Möglicherweise liegt ein Anschwellen des Chloroplasten über sein Ausgangsvolumen hinaus vor.

Im registrierten Kurvenverlauf der Konformationsänderungen der ST- Zellen kommt es nach der ersten schnellen Extinktionsänderung zu einer Depression, der eine erneute, langsame Extinktionszunahme folgt. Die Extinktionszunahme der zweiten Phase der ST- Zellen erreicht nach etwa 90 sec ein Plateau, das, im Gegensatz zum Kurvenverlauf der SW-Zellen, konstant erhalten bleibt.

Nach dem Ausschalten des Anregungslichtes ist das gesamte Signal der ST- Kultur reversibel. Einer schnell-

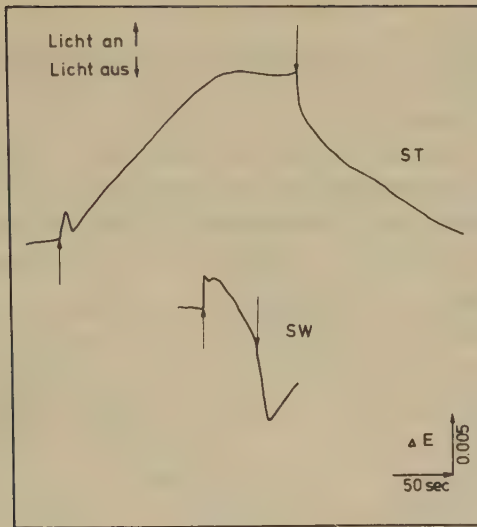


Fig. 33: Lichtinduzierte Konformationsänderungen in Zellen von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus. Die Zellen waren auf $6,5 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml Nährlösung eingestellt. Anregungslicht: oberhalb 630 nm ; $9 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Meßwellenlänge: 540 nm ; Schutzfilter: Corning: λ $380 - 580 \text{ nm}$.

len Extinktionsabnahme folgt ein langsamer Extinktionsrückgang.

Für die indirekten Messungen der Struktur- und Volumenänderungen mit Hilfe des Streulichtverfahrens kann für Scenedesmus-Zellen, die unter verschiedenen Lichtbedingungen gewachsen sind, folgende Aussage gemacht werden:

Das auf Volumenabnahme beruhende Signal der Chloroplasten der ST- Zellen ist mehr als 8 mal so groß wie das der SW-Chloroplasten. Für die Starklichtzellen kann im Vergleich zu den SW- Zellen angenommen werden, daß die stärkere Volumenabnahme des Chloroplasten mit einem höheren Phosphorylierungspotential korreliert.

4.8. $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung ganzer Zellen und RuDPC-ase-Aktivität

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden Veränderungen des Photosyntheseapparates im Bereich der Primärreaktionen von Scenedesmus-Zellen, die unter Stark- und Schwachlicht gewachsen sind, nachgewiesen.

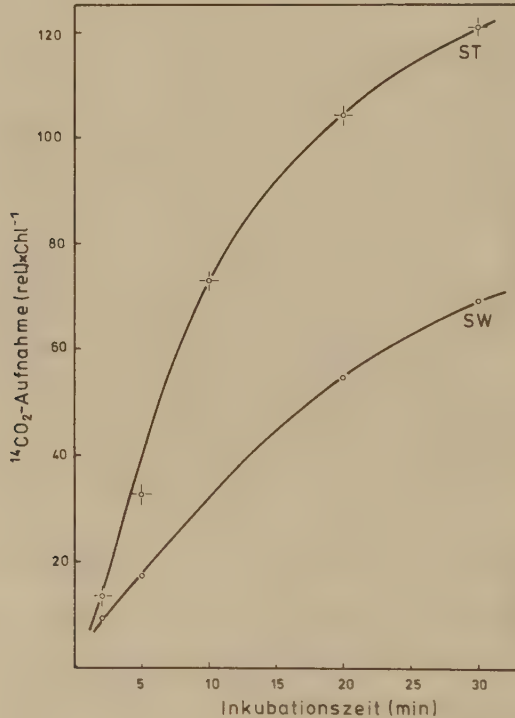


Fig. 34: $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung von Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Zellen (10 μl Chlorophyll/ ml) waren in Phosphatpuffer (pH 7,0; 0,05 M; MgCl_2 : 1×10^{-3} M; NaCl: $2,5 \times 10^{-3}$ M) suspendiert. Die Lichtintensität des Anregungslichtes betrug $0,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Zellen wurden 5 Minuten vorbelichtet.

In diesem Abschnitt wird die Photosyntheseleistung beider Kulturtypen, die als $^{14}\text{CO}_2$ - Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen wurde, beschrieben.

Die Zellen waren auf einen Chlorophyllgehalt von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und 5 Minuten lang vorbelichtet worden.

Aus den Kurvenverläufen der $^{14}\text{CO}_2$ - Fixierung kann man deutlich das frühzeitige Einschwenken der Kurve der SW- Zellen erkennen. Die Starklichtzellen fixieren im Sättigungsbereich etwa doppelt soviel $^{14}\text{CO}_2$ / Zeit wie die SW- Zellen (Fig. 34).

Aus den Ergebnissen kann man schließen, daß die Adaptation an hohe Lichtintensitäten während der Anzucht neben der Zunahme der Redox- Überträger pro Chlorophyll auch zur gesteigerten CO_2 - Aufnahme durch die Zellen führt.

In einem weiteren Versuch der $^{14}\text{CO}_2$ - Fixierung wurde die Enzymaktivität des "Schlüsselenzyms" des Calvinzyklus, die RuDPC-ase, untersucht.

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend dem Ansatz von BJÖRKMAN (1968). Der Ansatz wurde hinsichtlich MgCl_2 - Konzentration und Reaktionsstart nach Angaben von CHU und BASSHAM (1973) verändert.

Der Auswertung der Enzymaktivität der RuDPC-ase von dem pH-Wert wurde der höchste Meßwert als 100%-Marke zugrundegelegt. Aus Fig. 35 geht hervor, daß die maximale RuDPC-ase Aktivität / Protein des SW- Rohextraktes etwa 50% der Enzymaktivität des ST- Rohextraktes aufweist. Die unterschiedliche Enzymaktivität korreliert mit der Photosyntheseleistung der SW- und der ST- Zellen. Ähnliche Ergebnisse werden von BJÖRKMAN (1968) berichtet.

In Abhängigkeit vom pH-Wert des Bestimmungsansatzes zeigt sich eine Verschiebung der Aktivitätsmaxima.

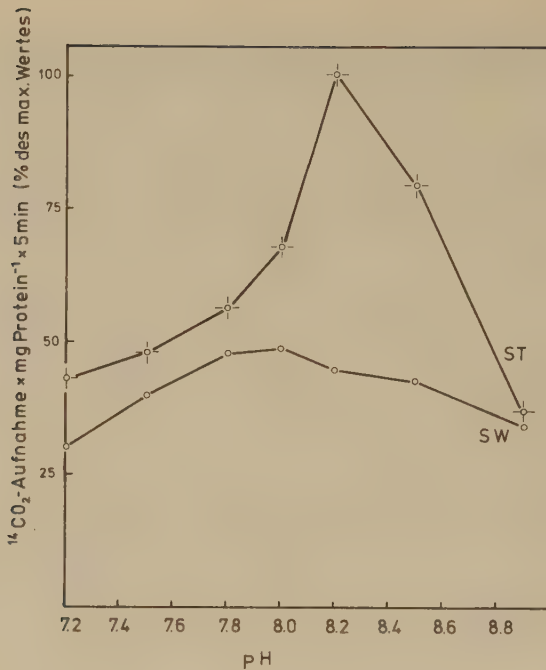


Fig. 35: RuDPC-ase- Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert. In den Reaktionsansatz wurden 0,1 ml des Enzymrohextraktes hinzupipettiert. Der Reaktionsansatz (0,4 ml) enthielt: RuDP: $0,15 \times 10^{-6}$ M; GSH: $1,25 \times 10^{-6}$ M; EDTA: $0,1 \times 10^{-6}$ M; Tris HCl: 1×10^{-5} M; $MgCl_2$: 8×10^{-6} ; Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von $2,5 \mu\text{mol NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($0,5 \mu\text{curie/mol}$). Inkubationszeit: 5 min; Temperatur: 25°C .

Das Maximum der RuDPC-ase- Aktivität der SW- Zellen ist mehr in den alkalischen Bereich verschoben und liegt bei einem pH- Wert von 8,2.

Die Verschiebung des Aktivitätsmaximums der RuDPC-ase der ST- Zellen rührt möglicherweise daher, daß auf der Thylakoidaußenseite im Stroma der Chloroplasten,

ein höherer pH-Wert vorherrscht als in SW- Zellen. Dieser Unterschied des pH- Wertes beider Kulturtypen im Matrixteil des Chloroplasten kann im Elektronentransport über die Thylakoidmembran begründet sein. Danach transportiert Plastochinon in den ST- Zellen aufgrund einer erhöhten Elektronenflußrate in verstärktem Maße Protonen von außen in die Thylakoidinnenräume.

Lichtabhängige pH-Änderungen im Stroma und im Thylakoidinnenraum wurden kürzlich von HELDT et al. (1973) nachgewiesen und in diesem Sinne interpretiert.

5. SCHLUßFOLGERUNGEN

Die Untersuchungen an homokontinuierlichen Kulturen von Scenedesmus obliquus haben Änderungen der Photosynthesekapazität erbracht, wenn die Zellen unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert wurden.

Die Photosyntheseleistung der unter Schwachlicht wachsenden Zellen weist im Lichtsättigungsbereich nur 35% der Photosyntheseleistung der ST- Zellen auf.

Wenn in den Stark- und Schwachlichtkulturen Unterschiede in der Photosyntheseleistung auftreten, so können dem bestimmte Änderungen im Photosyntheseparat zugrunde liegen:

1. Es verändert sich die Größe der Photosynthese-einheit.
2. Die Reaktionsgeschwindigkeit des photosynthetischen Elektronenflusses verändert sich.
 - a) Es werden die Poolgrößen der Reaktionspartner bei gleichbleibender Reaktionskinetik verändert.
 - b) Es verändert sich die Geschwindigkeitskonstante der Reoxidation von $PQ\ H_2$ bei gleichbleibenden Poolgrößen.
 - c) Beide, Poolgrößen der Reaktionspartner und Geschwindigkeitskonstante der Reaktion verändern sich.

Durch Untersuchungen der Teilreaktionen konnte gezeigt werden, daß Photosystem II sowie Änderungen innerhalb der Elektronentransportkette eher für die Unterschiede verantwortlich sind als Photosystem I.

Die Photosystem I- Reaktion der Stark- und Schwachlichtzellen ist gleich groß. Die Unterschiede der Photoreduktionsraten von Methylviologen an Partikeln von Stark- und Schwachlichtzellen werden auf variierende Poolgrößen der Intermediate in der Elektronentrans-

portkette zurückgeführt. Vermutlich werden die Elektronen der künstlichen Donoren DCPIP und DAD über Cyt f in die Redox- Kette eingeschleust.

Den Schwankungen der Photosyntheseleistung entsprechen die unterschiedlichen Aktivitäten der Hill-Reaktionen. Es zeigt sich, daß die Starklichtzellen bzw. Partikel der ST- Zellen für die Sättigung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung und den Hill-Reaktionen mit p-Benzochinon und DCPIP als Hill-Reagenzien höhere Lichtintensitäten benötigen als Zellen bzw. Partikel der SW-Kulturen. Die Lichtsättigungsrate der ST- Zellen bzw. Partikel ist in der p-Benzochinon- Hill-Reaktion 3 mal, in der DCPIP- Hill-Reaktion etwa 4 mal so groß wie in Schwachlichtzellen bzw. -Partikeln.

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Lichtintensität des Anregungslichtes haben im lichtlimitierenden Bereich keinen Unterschied des Kurvenanstiegs für beide Kulturtypen erbracht.

Für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung von einem $\mu\text{mol O}_2$ unter monochromatischem Licht (679 nm) wurde für beide Kulturen ein mittlerer Quantenbedarf von 11,3 (Quantenausbeute von $0,088 \mu\text{mol O}_2 \times \text{Einstein}^{-1}$) bestimmt.

Die unterschiedliche Photosystem II- Reaktion kann einerseits auf Poolgrößenänderungen von Reaktionspartnern oder andererseits auf Veränderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes des Elektronentransportes beruhen.

Die Poolgröße des primären Elektronenakzeptors von Photosystem II, Q, verändert sich nicht. Dies wird aus Hemmstoffversuchen mit DCMU geschlossen. DCMU hemmt in prozentual gleichem Umfang den Elektronenfluß im Reaktionszentrum von Photosystem II oder in der Nähe von Q.

Es wird angenommen, daß auf der oxidierenden Seite von Photosystem II Veränderungen im enzymatischen Bereich durch das Wachstum der Zellen unter hohen Lichtintensi-

täten auftreten, da die Hitzebehandlung der ST- Partikel zeitlich länger durchgeführt werden muß, als die Hitzebehandlung der SW- Partikel, um eine Inaktivierung des wasserspaltenden Systems zu erzielen.

Die Änderungen der Poolgrößen der Redox- Partner der nicht-zyklischen Elektronentransportkette weisen Schwankungen im Sinne der unterschiedlichen Photosyntheseleistungen auf.

Die Poolgröße von Cyt b_{559} LP ändert sich unter den gewählten Lichtanzuchtbedingungen in gleichem Umfang wie die potentielle Photosyntheseleistung. Ihre Veränderung deckt sich mit der unterschiedlichen Photosyntheseleistung (65%). Die Zunahme der Cyt b_{559} LP- Poolgröße macht die Beteiligung dieses Cytochroms am nicht-zyklischen Elektronentransport wahrscheinlich.

Den Untersuchungen von BÖHME und CRAMER (1972) zufolge sollte Cyt b_{559} LP vor dem Plastochinonpool angeordnet sein.

Plastohydrochinon ist in Zellen, die unter Starklicht wachsen, in größerem Maße vorhanden als in Schwachlichtzellen. Dies wird durch die höhere Zahl der DBMIB- Moleküle, die zur kompetitiven Hemmung des Elektronentransportes notwendig sind, eindeutig belegt. DBMIB hemmt den Elektronenfluß von Photosystem II nach Photosystem I kompetitiv, da es mit PQH_2 um die Reoxidation durch den nachfolgenden Partner konkurriert.

Dem reduzierten Plastochinonpool kommt für die nicht-zyklische Photophosphorylierung besondere Bedeutung zu. Plastochinon nimmt aus dem Stroma der Chloroplasten auf der Außenseite der Thylakoidmembran Protonen auf und schleust diese in den Thylakoidinnenraum. Die Zunahme des PQH_2 -Pools führt zu einer verstärkten pH-Erniedrigung in den Thylakoidinnenräumen der ST- Chloroplasten. Diese Annahme wird durch die lichtabhängige Zeaxanthin-Bildung durch die De-Epoxi-

dierung von Violaxanthin indirekt bestätigt. Die Zeaxanthin Bildung kann als Indikator für eine lichtabhängige pH-Wert- Erniedrigung im Thylakoidinnenraum dienen (HAGER 1967).

Aufgrund der Untersuchungen an Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus kann angenommen werden, daß infolge der Steigerung der Elektronenflußrate und des vermehrt vorliegenden PQH₂-Pools an den Thylakoidmembranen der ST- Zellen ein höherer Protonengradient aufgebaut wird als an den Membranen der SW- Zellen.

Die Messungen der Konformationsänderungen geben Aufschluß über die Struktur- und Volumenänderungen des Chloroplasten. Phase 2 des biphasischen Signals, das als Maß für das Phosphorylierungspotential gewertet wird, ist im Kurvenverlauf der ST- Zellen stärker ausgeprägt als im Kurvenverlauf der SW- Zellen. Dies bestätigt die Annahme, daß an den Thylakoiden der ST- Zellen ein höherer lichtabhängiger Protonengradient besteht als an den Thylakoiden der SW- Zellen.

Die lichtabhängige Protonierung des Thylakoidinnenraumes führt im Stroma des ST-Chloroplasten zu einem alkalischeren pH-Wert im Vergleich zu den SW-Chloroplasten. Dieser Mechanismus ist möglicherweise für die unterschiedliche pH-Abhängigkeit der RuDPC-ase- Aktivität verantwortlich.

Der Cyt f- Gehalt bezogen auf Chlorophyll weist im Vergleich beider Kulturtypen ähnliche Unterschiede auf wie die Photosyntheseleistung (Änderungen von 60%). Die Cyt f-Werte sind aus einem chemisch induzierten Differenzspektrum ermittelt worden. Im lichtinduzierten Differenzspektrum sind nicht so große Unterschiede festzustellen.

Mit der Steigerung der Lichtintensität während der Anzucht ist eine Zunahme der Poolgrößen der Redox-Teilnehmer der Elektronentransportkette zu verzeichnen. Die Zunahme der Intermediate unter Stark-

lichteinfluß führt zu einem gesteigerten Elektronenfluß von Photosystem II nach Photosystem I. Ein verstärkter Elektronenfluß konnte für die Abklingkinetik der Cyt f-Oxidation nach Bestrahlung mit monochromatischem Licht von 716 nm, für die Cyt f- Oxidation während der Anregung mit 640 nm- Licht und für die Absorptionsänderung bei 520 nm nachgewiesen werden.

Nach den vorliegenden Untersuchungen an den Dauerlichtkulturen ist die Steigerung des Elektronenflusses im wesentlichen in der Zunahme der Poolgrößen begründet. BOARDMAN et al. (1974) entwickeln ein Kollisionsmodell für die Redox- Reaktionen der photosynthetischen Elektronentransportkette von ST- und SW- Pflanzen. Danach zieht eine zweifache Zunahme einer Poolgröße (z.B. Cyt f) eine drei- vierfache Steigerung der maximalen Elektronenflußrate nach sich. Das heißt, daß sich die Geschwindigkeitskonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes (Reoxidation von PQH_2) unter verschiedenen Lichtintensitäten der Anzucht verändert. BOARDMAN et al. (1974) gehen aufgrund ihrer Messungen davon aus, daß sich die Photosyntheseeseinheit nicht verändert.

Die Poolgrößen von Q und P_{700} der homokontinuierlichen Kulturen von Scenedesmus bleiben konstant; das heißt, daß die Größe der Photosyntheseeseinheit unter Stark- und Schwachlicht unverändert bleibt.

Die Unterschiede der Photosyntheseleistung der homokontinuierlichen Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus werden demnach von der maximalen Elektronenflußrate bestimmt, die im wesentlichen mit den Poolgrößen von Cyt b_{559} LP und Cyt f korreliert. Die Frage, inwieweit neben der Elektronenflußrate durch Poolgrößenänderungen die Geschwindigkeitskonstante verändert wird, kann nicht beantwortet werden. Differenzen haben sich zwischen der Lichtsättigungsrate der Hill-Reaktionen mit p-Benzochinon (ST/SW=3) und

mit DCPIP (ST/SW=4) ergeben.

Im Entwicklungszyklus synchroner Scenedesmus- Zellen wurden Änderungen der Photosyntheseleistung festgestellt (SENGER, 1970a, b), die nicht auf der Variabilität der Größe der Photosyntheseeinheit beruht (MYERS und GRAHAM, 1975), sondern ihre Ursache in der Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Redox-Partner hat. Aber anders als in Stark- und Schwachlichtkulturen von Scenedesmus, wo vor allen Dingen die Poolgrößen der beteiligten Redox- Systeme verändert werden, variiert in den Synchronkulturen die Reoxidationsgeschwindigkeit von Plastochinon, während die Poolgrößen konstant bleiben (SENGER und FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

Diesen Untersuchungen zufolge muß eine geringe umweltabhängige Variationsbreite für die Größe der Photosyntheseeinheit von Scenedesmus obliquus angenommen werden, da Schwankungen der Photosyntheseleistung jeweils die Elektronenflußrate des photosynthetischen Elektronentransportes betreffen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Homokontinuierliche Dauerlichtkulturen von Scenedesmus obliquus, die unter Lichtintensitäten von 4000-Lux und 28000 Lux kultiviert werden, weisen Unterschiede in der Photosynthesekapazität auf.
Parallel zu den Änderungen der Photosyntheseleistung verlaufen die unterschiedlichen Hill-Aktivitäten.
Die lichtgesättigte O_2 -Entwicklung pro Chlorophyll der Schwachlichtzellen von Scenedesmus beträgt nur etwa 35% der Sättigungsrate der Starklichtzellen.
2. Im linearen Bereich der Intensitätskurven der Photosynthese treten keine Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen beider Kulturen auf. Die Quantenausbeute der Photosynthese beträgt für beide Kulturtypen $0,08 \mu\text{mol } O_2 \times \text{Einstein}^{-1}$.
3. Änderungen der Redox-Systeme der Elektronentransportkette wurden an Cyt f, Cyt b_{559} , Cyt b_{563} sowie an P_{700} untersucht und quantitativ bestimmt. Außerdem können durch Hemmstoffversuche indirekte Aussagen zu den Poolgrößen des Quenchers Q und Plastohydrochinon gemacht werden:
 - a) Die Poolgröße von P_{700} zu Chlorophyll zeigt keine Veränderungen durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen
 - b) der Gehalt an Cyt f bzw. Cyt b_{559} LP der Kultur beträgt nur 40% bzw. 35% des entsprechenden Gehaltes der ST- Kultur.
 - c) Die Poolgrößen von Cyt b_{563} (50%) und Cyt b_{559} HP (30%) weisen Änderungen geringeren Ausmaßes auf.

- d) Die Zunahme des Plastohydrochinonpools unter Starklichteinfluß konnte durch den Mehrbedarf an DBMIB-Molekülen, der zur kompetitiven Hemmung des Elektronenflusses notwendig ist, nachgewiesen werden.
 - e) Die Poolgröße des Quenchers Q muß aufgrund der Hemmstoffversuche mit DCMU als konstant angesehen werden.
4. Die Photosyntheseleistung von Scenedesmus, gemessen als $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme, verändert sich. Änderungen sind auch in der RuDCP-ase- Aktivität festzustellen. Die RuDPC-ase- Aktivität bezogen auf Protein der SW- Kultur weist lediglich 50% der Aktivität der ST- Kultur auf. Die RuDPC-ase- Aktivität zeigt eine unterschiedliche pH-Abhängigkeit.
 5. Die Zunahme der Poolgrößen von Cyt f und Plastohydrochinon sind für die Steigerung der Elektronenflußrate verantwortlich zu machen. Es wird angenommen, daß Cyt b_{559} LP im nicht-zyklischen Elektronentransportweg angeordnet ist.
 6. Die Steigerung des Elektronenflusses nach Anzucht der Zellen unter hohen Lichtintensitäten wird indirekt durch die Cyt f- Oxidation während der Anregung mit 640 nm Licht und durch die Abklingkinetiken der Cyt f- Oxidation nach Anregung mit 716 nm Licht verdeutlicht. Die Unterschiede von Phase 2 der Absorptionsänderung bei 520 nm werden ebenfalls in diesem Sinne interpretiert.
 7. Der in den Starklichtzellen von Scenedesmus in größerem Umfang vorliegende Plastohydrochinonpool, sowie die höhere Elektronenflußrate bewirken eine pH-Erniedrigung in den Thylakoidinneräumen der Chloroplasten. Dies geht indirekt aus den Messungen der Xanthophyllgehalte hervor.

8. Belichtung der Algenzellen führt zu Struktur- und Volumenänderungen des Chloroplasten. Phase 2 des dabei entstehenden biphasischen Signals wird als Maß für die Änderungen des Protonengradienten und somit des Phosphorylierungspotentials gewertet. Die Kultivierung der Scenedesmus-zellen unter hohen Lichtintensitäten führt zu einer Erhöhung des Phosphorylierungspotentials.

Die größte Photosynthesekapazität der Starklichtzellen wird in der Erhöhung der Elektronenflußrate durch Poolgrößenveränderungen gesehen, da die Größe der Photosyntheseeinheit konstant bleibt. Es erscheint für Scenedesmus obliquus zutreffend, daß strukturelle Änderungen sowie Änderungen im Photosyntheseapparat durch Stark- und Schwachlichteinfluß sich auf die Elektronenflußrate des photosynthetischen Elektronentransportes auswirken.

7. LITERATUR

- AMESZ, J. (1973): The function of plastoquinone in photosynthetic electron transport.
 Biochim. Biophys. Acta 301, 35-51
- und De GROOTH, B.G. (1975): Light-induced absorbance changes due to photosystem I and II in spinach chloroplasts at -50°C.
 Biochim. Biophys. Acta 376, 298-307
- ; VISSER, J.W.M.; Van Den ENGH, G.J. und DIRKS, M.P. (1972): Reaction kinetics of intermediates of the photosynthetic chain between the two photosystems.
 Biochim. Biophys. Acta 256, 370-380
- ANDERSON, J.M., GOODCHILD, D.J. und BOARDMAN, N.K. (1973): Composition of the photosystem and chloroplast structure in extreme shade plants.
 Biochim. Biophys. Acta 325, 573-585
- AVRON, M. und SHNEYOUR, A. (1971): On the site of action of plastocyanin in isolated chloroplasts.
 Biochim. Biophys. Acta 226, 498-500
- BALLANTINE, J.E.M. und FORDE, B.J. (1970): The effect of light intensity and temperature on plant growth and chloroplast ultrastructure in soybean.
 Amer. J. Bot. 57 (10), 1150-1159
- BAUER, R. (1972): Die Photomorphogenese des photosynthetischen Apparates grüner Pflanzen, untersucht mit Hilfe des Kautsky-Effektes.
 Dissertation, TH Aachen
- BEARDEN, A.J. und MALKIN, R. (1973): Oxidation - reduction potential dependence of low-temperature photoreactions of chloroplast photosystem II.
 Biochim. Biophys. Acta 325, 266 - 274

- BEDELL, G.W. und GOVINDJEE (1973): Photophosphorylation in intact algae : Effects of inhibitors, intensity of light, electron acceptors and donors. *Plant Cell Physiol.* 14, 1081-1097
- BENDALL, D.S. (1968): Oxidation-reduction potentials of cytochromes in chloroplasts from higher plants. *Biochem. J.* 109, 46-47
- ; SOFROVA, D.S. (1971): Reactions at 77°K in photosystem II of green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 234, 371-380
- BISHOP, N.I. (1958): The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 27, 205-206
- ; (1959): The reactivity of a naturally occurring quinone (Q-255) in photochemical reactions of isolated chloroplasts. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 45, 1996-1702
- ; (1971): Photosynthesis: The electron transport system of green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40, 197-226
- ; (1973): Analysis of photosynthesis in green algae through mutation studies
In: *Current Topics in Photobiology and Photochemistry*.
Photophysiology, Vol. III: 65-96, Academic Press, New York and London
- und SENGER, H. (1971): Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus.
In: A. SAN PIETRO (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. XXIII: 53-66, Academic Press, New York and London
- BJÖRKMÄN, (1968): Further studies on differentiation of photosynthetic properties in sun and shade ecotypes of Solidago virgaurea
Physiol. Plant 21, 84-99

- ; (1968): Carboxydismutase activity in shade-adapted species of higher plants.
Physiol. Plant 21, 1-10
- ; (1972): Photosynthetic adaptation to contrasting light climates.
Carnegie Institution Year Book 71, 82-85
; BOARDMAN, N.K., ANDERSON, J.M., THORNE, S.W., GOODCHILD, D.J. and PYLIOTIS, A. (1972): Effect of light intensity during growth of Atriplex patula on the capacity of photosynthetic reactions, chloroplast components and structure.
Carnegie Institution Year Book, 71, 115-135
- und HOLMGREN, P. (1963): Adaptability to the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats.
Physiol. Plant. 16, 889-914
- -- (1966): Photosynthetic adaptation to light intensity in plants native to shaded and exposed habitats.
Physiol Plant. 19, 854-859
- BOARDMAN, N.K. und ANDERSON, J.M. (1967): Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. II. Cytochrome and carotenoid content of particles isolated from spinach chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 143, 187-203
- -- ; HILLER, R.G.; KAHN, A.; ROUGHAN, P.G.; TREFFRY, T.E. und THORNE, S.W. (1971): The development of photochemical activities during greening of etiolated barley.
In: G. FORTI et al. (eds.), Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research: 2265-2287, W. Junk Publ., The Hague
- -- ; THORNE, S.W. und BJÖRKMAN, O. (1972): Photochemical reactions of chloroplasts and components of the photosynthetic electron transport chain in two rainforest species.
Carnegie Institution Year Book 71, 107-114

- ; BJÖRKMAN, O.; ANDERSON, I.M.; GOODCHILD, D.J. und THORNE, S.W. (1974): Photosynthetic adaptation of higher plants to light intensity : Relationship between chloroplast structure, composition of the photosystems and photosynthetic rates.
In: M. AVRON (ed.) Proc. 3rd Int. Congr. on Photosynthesis: 1809-1827, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam.
- BÖHME, H. und CRAMER, W.A. (1971): Plastoquinone mediates electron transport between cytochrome b_{559} and cytochrome f in spinach chloroplasts.
FEBS Lett. 15, 349-351
- -- (1972): The role of cytochrome b_6 in cyclic electron transport: Evidence for an energy coupling site in the pathway of cytochrome b_6 oxidation in spinach chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 283, 302-315
- ; REIMERS, S. und TREBST, A. (1971): The effect of dibromothymoquinone, an antagonist of plastoquinone, on non-cyclic and cyclic electron flow isolated chloroplasts.
Z. Naturforsch. 26 b, 341-352
- und TREBST, A. (1969): On the properties of ascorbate photooxidation in isolated chloroplasts. Evidence for two ATP sites in non cyclic photophosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 180, 137-148
- BUTLER, W.L.; VISSER, J.W.M. and SIMONIS, H.L. (1973): The kinetics of light- induced changes of C-550, cytochrome b_{559} and fluorescence yield in chloroplasts at low temperature.
Biochim. Biophys. Acta 292, 140-151
- CHANCE, B.; De VAULT, D.; HILDRETH, H.W.; PARSON, N.W. und NISHIMURA, M (1966): Early chemical events in photosynthesis : Kinetics of oxidation of cytochromes of types c or f in cells, chloroplasts, and chromatophores.
In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus. Brookhaven Symposium Biol. 19, 115-131

- CHENIAE, G.M (1970): Photosystem II and O_2 - evolution.
Ann. Rev. Plant Physiology 31, 467-498
- und MARTIN, I.E. (1971): Photoactivation of the
 manganese catalyst of O_2 - evolution. I. Bio-
 chemical and kinetic aspects.
Biochim. Biophys. Acta 253, 167-181
- -- (1973): Absence of Oxygen evolving capacity in
 dark-grown Chlorella: The photoactivation of oxygen
 evolving centers.
Photochem. and Photobiol. 17, 441-459
- CHU, D.K. und BASSHAM, J.A. (1973): Activation and in-
 hibition of ribulose 1,5- diphosphate carboxylase
 by phosphogluconate.
Plant Physiol. 52, 373-379
- -- (1974): Activation of ribulose 1,5- diphosphate
 carboxylase by nicotinamide adenine dinucleotide
 phosphate and other chloroplast metabolites.
Plant Physiol. 54, 556-559
- COX, R.P. and BENDALL, D.S. (1972): The effects on
 cytochrome b_{559} HP and P_{546} of treatments that
 inhibit oxygen evolution by chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 283, 124-135
- CRAMER, W.A. und BÖHME, H. (1972): High potential
 Cytochrome b_{559} as a secondary quencher of
 chloroplast fluorescence of 3-(3,4- dichlorophe-
 nyl)-1, 1-dimethylurea.
Biochim. Biophys. Acta 256, 358-369
- DELOSME, R. (1971): New results about chlorophyll
 fluorescence in vivo.
 In: G. FORTI et al. (eds.), *Proc. 2nd Int. Congr.
 on Photosynthesis Research: 187-195*, W.Junck
 Publ., The Hague
- DÖRING, G. (1975): Further results on the photoactive
 chlorophyll a_{II} in photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 376, 274-284

- DUYSENS, L.N.M. (1970): Photobiological principles and methods
In: P. HALLDALL (Ed.) Photobiology of Microorganisms, 1-16, Wiley - Interscience, London, New York, Sydney, Toronto
- und AMESZ, J. (1962): Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 64, 243-260
- und SWEERS, H.E. (1963): Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence.
In: Studies of Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Special Issue of Plant and Cell Physiology, Japan. Soc. Plant Physiologists, Tokyo, 353-372
- EASTBROOK, A.W. (1967): Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O Ratios.
In: A.W. EASTBROOK and M.E. FULLMAN (eds.), Methods in Enzymology, Vol X, 41-47, Academic Press, New York and London
- ERIXON, K. und BUTLER, W.L. (1971): The relationship between : C-550 and cytochrome b_{559} in photo-reactions at - 196°C in chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 234, 381-389
- FAN, H.N. und CRAMER, W.A. (1970): The redox potential of cytochromes b_{559} and b_{563} in spinach chloroplast
Biochim. Biophys. 216, 200-207
- FLOYD, R.A.; CHANCE, B. and De VAULT, D. (1971): Low temperature photo-induced reactions in green leaves and chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 226, 103-112
- FORK, D.C. (1971): Studies on the oxidation-reduction reactions of grana particles prepared from spinach chloroplasts by a nondetergent method
Carnegie Institution Year Book 70, 472-482

- und JACOBI, G. (1971): Photochemical reactions of P₇₀₀ and cytochrome f and the action of plastocyanin in a grana stack preparation from spinach.
Carnegie Institution Year Book 69, 690-691
- ; JAMES, Z. und ANDERSON, J.M. (1966): Light-induced reactions of chlorophyll b and P₇₀₀ in intact plants and chloroplast fragments.
In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus.
Brookhaven Symposium Biol. 19, 81-94
- und MURATA, N. (1971): Studies of light-induced changes of absorption in fraction 1 particles derived from spinach chloroplasts by French-pressure cell treatment.
Carnegie Institution Year Book 70, 461-468
- und URBACH, W. (1965): Evidence for the localization of plastocyanin in the electron transport chain of photosynthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1307-1315
- -- (1966): Studies made in vivo on the role of plastocyanin in photosynthesis.
In: J.B. THOMAS and GOODHEER (Eds.), Currents in Photosynthesis, 293-309, A.D. Donker - Publisher, Rotterdam
- FRICKEL-FAULSTICH, B. (1974): Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyklus.
Dissertation, Marburg
- FRICKEL-FAULSTICH, B. und SENGER, H. (1972): Änderungen der DCMU-Empfindlichkeit während des Entwicklungszyklus von Scenedesmus obliquus.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 85, 401-408
- GOODCHILD, D.J.; BJÖRKMAN, O. und PHYLIOTIS, N.A. (1972): Chloroplast ultrastructure, leaf anatomy and content of chlorophyll and soluble protein in rainforest species.
Carnegie Institution Year Book 71, 102-107.

- GOODWIN, T.W. (1971): Biosynthesis of Chloroplasts
In: M. GIBBS (ed.) Structure and Function of Chloroplasts.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- GORMAN, D.S. und LEVINE, R.P. (1965): Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 1665-1669
- GOVINDJEE (1972): Discussions on chlorophyll fluorescence in vivo : techniques and applications.
In: G. JACOBI (ed.), Chloroplast Fragments, 17-45, Workshop, Göttingen
- MUNDAY, I.D. und PAPAGEORGIOU, G. (1966): Fluorescence studies with algae: changes with time and pre-illumination.
In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus.
Brookhaven Symposium Biol., 434-445
- GRAHL, H. und WILD, A. (1972): Die Variabilität der Photosyntheseeinheit bei Licht- und Schattenspflanzen.
Z. Pflanzenphysiol. 67, 443-453
- GRIMME, L.H. und BOARDMAN, N.K. (1973): Separation of photosynthetic system I and II from a chloroplast preparation from Chlorella.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 344, 1499-1502
- GROMET-ELHANAN, Z. und REDLICH, N. (1972): Diaminodurene-induced electron transport from water or ascorbate to oxygen and its relation to the sites of cyclic and noncyclic photophosphorylation.
In: G. FORTI (ed.) Chloroplast Fragments, 129-138, Workshop, Göttingen.
- HAEHNEL, W. (1973): Electron flow between plastoquinone and chlorophyll a_1 in chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta, 305, 618-631

- (1974): Light-induced absorbance changes of plastocyanin in situ and its functional role in Chloroplasts.
In: M. AVRON (ed.), Proc. 3rd Int. Congr. on Photosynthesis, 557-568, Elsevier, North Holland, Amsterdam
- HAGER, A. (1967): Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen Xanthophyllumwandlungen an Chlorella und Spinacia.
Planta, 74, 148-172
- HEBER, U (1969): Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo.
Biochim. Biophys. Acta 180, 302-319
- (1974): Metabolic exchange between chloroplast and cytoplasm
Ann. Rev. Plant Physiology 25, 393-421
- HELDT, H.W. und WERDAN, K. (1973): pH-Änderungen in Chloroplastenstroma durch energieabhängigen Protonentransport über die Thylakoidmembran.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 86, 203-208
- -- ; MILOVANCEV, M. und GELLER, G. (1973): Alkalization of the Chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space.
Biochim. Biophys. Acta 314, 224-241
- HENNINGSEN, K.W. und BOARDMAN, N.K. (1973): Development of photochemical activity and the appearance of the high potential form of cytochrome b_{559} in greening barley seedlings.
Plant Physiol. 51, 1117-1126
- HILL, R. und BENDALL, F. (1967): Oxidation-reduction potentials in relation to components of the chloroplasts.
In: T.H. GOODWIN (ed.), Biochemistry of Chloroplasts, 559-564, Academic Press, London and New York
- -- (1960): Function of two cytochrome components in chloroplasts : a working hypothesis
Nature 186, 136-137

- HILLER, R.G.; ANDERSON, I.M. and BOARDMAN, N.K.
(1971): Photooxidation of cytochrome b_{559} in leaves and chloroplasts at room temperature
Biochim. Biophys. Acta 247, 439-452
- HIND, G. and OLSON I.M. (1966): Light-induced changes in cytochrome b_5 in spinach chloroplasts.
In: Energy Conversion by Photosynthetic Apparatus. Brookhaven Symposium Biol. 19, 166-193
- HIYAMA, T. and KE, B. (1971): P-330 : A possible primary electron acceptor of photosystem I.
In: G. FORST et al. (eds.), Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research, 491-498, W. Junk, Publ. The Hague
- : NISHIMURA, M. and CHANCE, B. (1969): Energy and electron transfer system of Chlamydomonas reinhardtii.
I. Photosynthetic and respiratory cytochrome systems of a pale green mutant.
Plant Physiol., 44, 527-534
- INOUE, Y.; KOBAYASHI, Y.; SAKAMOTO, E. and SHIBATA, K. (1974): Action spectrum for photoactivation of the water-splitting system in plastids of intermittently illuminated wheat leaves.
Physiol. Plant. 32, 228-232
- IZAWA, S.; CONNOLLY, I.N.; NINGST, G.D. and GOOD, N.E. (1966): Inhibition and uncoupling of phosphorylation in chloroplasts.
In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus
Brookhaven Symposium Biol. 19, 169-187
- : HEATH, R.L. and HIND, G. (1969): The role of Chloride ion in photosynthesis. - III. The effect of artificial electron donors upon electron transport.
Biochim. Biophys. Acta 190, 388-396

- ; GOULD, I.M.; ORT, D.R.; FELKER, P. und GOOD, N.E. (1973): Electron transport and photophosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. III. A dibromothymoquinone-insensitive phosphorylation reaction.
 Biochim. Biophys. Acta 305, 119-128
- JOLIOT, P. und JOLIOT, A. (1973): Different types of quenching involved in photosystem I centers.
 Biochim. Biophys. Acta 303, 302-316
- -- (1974): Comparative study of the 520 nm absorption change and delayed luminescence in algae. In: M. AVRON (ed.), Proc. 3rd Int. Congr. on Photosynthesis, 25-39, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam
- -- ; BOUGES, B. und BARBIERI G. (1971): Studies of system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence and oxygen emission.
 Photochem. and Photobiol. 14, 287-305
- KATOH, S. (1972): Studies on electron transport associated with photosystem. - II. Role of plastocyanin in methylviologen reduction in French-pressure treated chloroplasts
 Biochim. Biophys. Acta 283, 293-301
- ; SATOH, K.; IKEGAMI, Y.; KIMIMURA, M. und TAKAMIYA, A. (1971): Electron transport system associated with oxygen evolution in chloroplasts. Reaction sites of inhibitors and electron donors. In: G. FORTI et al. (eds.), Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research, 525-538, W. Junk Publ., The Hague
- KAWASHIMA, N. und WILDMAN, S.G. (1970): Fraction I protein.
 Ann. Rev. Plant Physiology 21, 325-358
- KE, B. (1973): The primary electron acceptor of photosystem I.
 Biochim. Biophys. Acta 301, 1-33

- ; VERNON, L.P. und CHANEY, T.H. (1972): Photo-reduction of cytochrome b_{559} in a photosystem II-subchloroplast particle.
Biochim. Biophys. Acta 256, 345-357
- KESSLER, E.; ARTHUR, W. und BRUGGER, I.E. (1957): The influence of manganese and phosphate on delayed light emission, fluorescence, photoreduction and photosynthesis in algae.
Arch. Biochem. 71, 326-335
- KIMIMURA, M. und KATOH, S. (1972): Studies on electron transport associated with photosystem I. 1. Functional site of plastocyanin. Inhibitory effects of $HgCl_2$ on electron transport and plastocyanin in chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 283, 268-278
- KNAFF, D.B. (1973): Contrasting effects of plastocyanin on the photooxidation and photoreduction of cytochrome f in chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 292, 186-192
- und ARNON, D.I. (1969) Light-induced oxidation of a chloroplast b-type cytochrome at $-189^{\circ}C$.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 956-962
- -- (1969b): A concept of three light reactions in photosynthesis by green plants.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 715-722
- -- (1971): On two photoreactions in system II of plant photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 226, 400-408
- und MALKIN, R. (1974): The effect of temperature on the primary reaction of chloroplast photosystem II. - Evidence for a temperature-dependent back reaction.
Biochim. Biophys. Acta 347, 395-403
- KOK, B; FORBUSH, B. und Mc GLOIN, M.N. (1970): Cooperation of charges in photosynthetic O_2 -evolution - I. A linear four step mechanism.
Photochem. Photobiol. 11, 457

- KRATZ, W.A. und MYERS, J. (1955): Nutrition and growth of several blue-green algae.
Amer. J. Bot. 42, 282-287
- KRINSKY, N.I. (1968): The protective function of the carotenoid pigments.
In: A.C. GIESE (ed.) Photophysiology 3, 123-195 Academic Press, New York and London
- LAING, W.A.; OGREN, W.L. und HAGEMANN, R.H. (1974): Regulation of soybean photosynthetic CO₂ Fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose 1,5 - diphosphate carboxylase
Plant Physiol. 54, 678 - 685
- LARKUM, A.W.D. und BONNER, W.D. (1972): The effect of artificial electron donor and acceptor systems on light-induced absorbance responses of cytochromes f and other pigments in intact chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 267, 149-159
- (1972) light-induced oxidation of cytochrome f in isolated chloroplasts of Pisum sativum
- LESSLER, M.A. (1972): Macro- and micro -oxygen electrode technique for cell-measurements.
In: D.M. PRESCOTT (ed.), Methods of Cell Physiology, Vol. V, 199-218, Academic Press, New-York and London
- LEVINE, R.P. (1969 a): Analysis of photosynthesis using mutant strains of algae and higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiology 20, 523-540
- LICHTENTHALER, H.K. (1973): Regulation der Lipochinon synthese in Chloroplasten
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, 439-442
- Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe, Isolierung und Lipochinonzusammensetzung
Protoplasma 68, 65-77
- LIEN, S. und BANNISTER, T.T. (1971): Multiple sites of DCPIP- reduction by sonicated oat chloroplasts: Role of plastocyanin
Biochim. Biophys. Acta 245, 465-481

- LORENZEN, H. (1959): Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender Chlorella bei langfristig intermittierender Belichtung.
Flora 147, 382-404
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.I.; FARR, A.L. und RANDALL, R.I. (1951): Protein measurements with the folin phenol reagent.
I. *biol. Chem.* 193, 265-275
- MALKIN, R. und BEARDEN, A.J. (1973): Light-induced changes of bound chloroplast plastocyanin as studied by EPR spectroscopy: The role of plastocyanin in noncyclic photosynthetic electron transport.
Biochim. Biophys. Acta 292, 169-185
- und MICHAELI, G. (1971): Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. IV. The inhibition of electron transfer from primary to secondary electron carriers of PS-II at low temperature and by DCMU.
In: D. FORTI et al (eds.), *Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research*, 149-168, W. Junck Publ., The Hague
- MATHIS, P. und VERMEGLIO, A. (1974): Direct evidence for a back reaction in photosystem II of spinach chloroplasts following flash excitation at low temperature.
Biochim. Biophys. Acta 368, 130-134
- Mc INTOSH, A.R., CHU, M. and BOLTON, I.R. (1974): Flash photolysis electron spin resonance studies of the light reversible counterpart to signal 1 at low temperatures in spinach subchloroplast particles - the true primary acceptor of photosystem I?
In: M. AVRON (ed.), *Proc. 3rd Int. Congr. on Photosynthesis*, 389-398, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam

- MELL, V. (1974): Herstellung und Funktion subzellulärer, photosynthetisch aktiver Partikel aus einzelligen Grünalgen.
Staatsexamensarbeit, Marburg
- MURAKAMI, S. und PARKER, L. (1970): Light-induced changes in the conformation and configuration of the thylakoid membrane of Ulva and Porphyra chloroplasts in vivo.
Plant Physiol 45, 289-299
- MURATA, N. und FORK, D.C. (1971): Oxidation-reduction reactions of system I particles prepared by French pressure cell treatment of spinach chloroplasts.
Carnegie Institution Year Book 70, 468-472
- MYERS, J. und GRAHAM, I. R. (1971): The photosynthetic unit in Chlorella measured by repetitive short flashes.
Plant Physiol. 48, 282-286
- (1975): Photosynthetic unit size during synchronous life cycle of *Scenedesmus*.
Plant Physiol. 55, 686-688
- NEUMANN, J.; NELSON, N.; ARNTZEN, C.J. und DILLEY, R.A. (1972): Phosphorylation studies in digitonin subchloroplast particles.
In: G. JACOBI, Chloroplast Fragments, 139-154
Workshop, Göttingen
- OGAWA, T. und SHIBATA, K. (1973): Selective formation of photosystem I under illumination at low intensity.
Physiol. Plant. 29, 112-117
- ÖQUIST, G. (1974): Distribution of Chlorophyll between the two photoreactions in photosynthesis of the blue-green alga Anacystis nidulans grown at two different light intensities.
Physiol. Plant 30, 38-44

- (1974): Light-induced changes in pigment composition of photosynthetic lamellae and cell-free extracts obtained from the blue-green alga Anacystis nidulans
 Physiol. Plant 30, 45-48
- PARK, R.B. und SANE, P.V. (1971):
 Distribution of function and structure in chloroplast lamellae.
 Ann. Rev. Plant Physiology 22, 395-430
- PFAU, J. und SENGER, H. (1972): Über die Länge der Entwicklungszyklen in homokontinuierlichen Kulturen von Scenedesmus obliquus.
 Ber. Dtsch. Bot. Ges. 85, 409-413
- PLESNICAR, M. und BENDALL, D.S. (1973): The photochemical activities and electron carriers of developing barley leaves.
 Biochim. J. 136, 803-812
- PRATT, L.H. und BISHOP, N.I. (1968): The 520 nm - light-induced absorbance change in photosynthetic mutants of Scenedesmus.
 Biochim. Biophys. Acta 162, 369-379
- REGER, B.J. und KRAUSS, R.W. (1970): The photosynthetic response to a shift in the chlorophyll a to chlorophyll b ratio of Chlorella.
 Plant Physiol. 46, 568-575
- RENGER, G. (1971): The acceleration of deactivation.- Kinetics in the water-splitting enzyme system of photosynthesis by chemicals.
 In: G. FORTI et al. (eds.) Proc. 2nd Int. Congr. on Photosynthesis Research, 53-60, W. Junck Publ., The Hague
- (1974): Studies on the reaction mechanism of the oxidizing equivalents produced by system II.
 In: M.AVRON (ed.), Proc. 3rd Int. Congr. on Photosynthesis, 127-146, Elsevier, North Holland Publ., Amsterdam

- ; BOUGES-BOCQUET, B. und DELOSME, R. (1973):
Studies on the ADRY- agent induced mechanism on
the discharge of the holes trapped in the photo-
synthetic water-splitting enzyme Y.
Biochim. Biophys. Acta 292, 796-807
- SAHA, S. OUITRAKUL, R. und IZAWA, S. (1971): Electron
transport and photophosphorylation in chloroplasts
as a function of the electron acceptor.
J. Biol. Chem. 246, 3204-3209
- SCHÄFER, M. (1975): ATP-Pool-Bestimmungen und Konfor-
mationsänderungen während des Entwicklungsver-
laufes von Scenedesmus obliquus in Synchronkul-
turen.
Dissertation, Marburg
- SCHLIEPHAKE, W.; JUNGE, W. und WITT, H.T. (1968):
Correlation between field formation, proton
translocation and the light reactions in photo-
synthesis.
Z. Naturforsch. 23b, 1571-1578
- SENGER, H. (1970 a): Charakterisierung einer Synchron-
kultur von Scenedesmus obliquus, ihrer potentiellen
Photosyntheseleistung und des Photosynthese- Quo-
tienten während des Entwicklungszyklus.
Planta 90, 243-266
- (1970 b): Quantenausbeute und unterschiedliches
Verhalten der beiden Photosysteme des Photosyn-
theseapparates während des Entwicklungsablaufes
von Scenedesmus obliquus in Synchronkulturen.
Planta 92, 327-346
- Quantum yield of photosynthesis in synchronous
cultures of algae.
In: E. BRODA et al. (eds.), Proc. 1st Europ.
Biophys. Congr., 33-36, Wiener Med. Akad.
- und FRICKEL-FAULSTICH (1974): The regulation of
electron flow in synchronized cultures of green
algae.
In: M. AVRON (ed.), Proc. 3rd Int. Congr. on Photo-
synthesis, 715-727, Elsevier, North Holland Publ.,
Amsterdam

- und MELL, V. (1975): Preparation on photosynthetically active particles from synchronized cultures of unicellular algae.
Im Druck
- ; PFAU, J. und WERTHMÜLLER, K. (1972): Continuous cultivation of homocontinuous and synchronized microalgae.
In: D.M. PRESCOTT (ed.), Methods in Cell Physiology, Vol. V., 301-323
- und WOLF, H.J. (1964): Eine automatische Verdünnungsanlage und ihre Anwendung zur Erzielung homokontinuierlicher Chlorella- Kulturen.
Arch. für Mikrobiol. 48, 81-94
- SIEFERMANN, D. und YAMAMOTO, H. Y. (1975): Light-induced de-epoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron transport conditions on violaxanthin availability.
Biochim. Biophys. Acta 387, 149-158
- STIEHL, H.H. und WITT, H.T. (1968): Die kurzzeitigen ultravioletten Differenzspektren bei der Photosynthese.
Z. Naturforsch. 23 b, 220-224
- -- (1969): Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis.
Z. Naturforsch. 24 b, 1588
- STROTMANN, H. und V. GÖSSELN, Ch. (1972): Photosystem I-abhängige Phosphorylierung isolierter Chloroplasten mit Ascorbat/2,6 Dichlorphenolindophenol als Elektronen Donator und Methylviologen als Elektronen Akzeptor.
Z. Naturforsch. 27 b, 445-455
- TREBST, A. (1974): Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts.
Ann. Rev. Plant Phys. 25, 423-458

- und ECK, H. (1961): Chinone in photosynthetischen Phosphorylierungen.
Z. Naturforsch. 16b, 44-49
- : HARTH, E. und DRABER (1970): On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated Chloroplasts.
Z. Naturforsch. 25 b, 1157-1159
- und HAUSKA, G. (1974): Energiekonservierung in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten.
Naturwissenschaften 61, 308-316
- und PISTORIUS, E. (1965): Zum Mechanismus des photosynthetischen Elektronentransportes in isolierten Chloroplasten.
Z. Naturforsch. 20 b, 143-132
- TROUGHTON, J.H. und FORK, D.C. (1974): Light adaptation of cytochrome f reactions in Ulva.
Carnegie Institution Year Book 73, 661-670
- VATER, J. (1973): On the nature of the deactivator of the water-splitting enzyme system in photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 325, 149-156
- VERMEGLIO, A. und MATHIS, P. (1974): Light-induced absorbance changes at -170°C with spinach chloroplasts.- Charge separation and field effect.
Biochim. Biophys. Acta 368, 9-17
- -- (1973): Photooxidation of cytochrome b_{559} and the electron donors in chloroplast photosystem II
Biochim. Biophys. Acta 292, 763-771
- VERNON, L.P. and SHAW, E.R. (1969): Photoreduction of 2,6 - Diphenolindophenol by Diphenylcarbazine.
A. Photosystem II- Reaction catalyzed by Tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments.
Plant Physiol. 44, 1645-1649
- WADA, K. und ARNON, D.J. (1971): Three forms of cytochrome b_{559} and their relation to photosynthetic activity of chloroplasts.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 3064-3068

- WILD, A.; KE, B. und SHAW, E.R. (1973): The effect of light-intensity during growth of Sinapis alba on the electron transport components.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 344-350
- WITT, H.T. (1971): Coupling of quanta, Electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis.
Quater. Rev. of Biophysics 4, 365-477
- WOOD, P.M. and BENDALL, D.S. (1975): The kinetics and specificity of electron transfer from cytochromes and copper proteins to P₇₀₀.
Biochim. Biophys. Acta 387, 115-118
- YAMASHITA, T. und BUTLER, W.L. (1968): Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts.
Plant Physiol. 43, 1978-1986

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich
Biologie - Botanik - der Philipps-Universität
Marburg/Lahn.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Senger
für die Themenstellung sowie die Betreuung der Arbeit
danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Kulandaivelu für
viele anregende Diskussionen und die experimentelle
Einarbeitung bei Versuchen mit radioaktiv markiertem
Material; Frau Altmann für die Mithilfe bei der Durch-
führung einiger Experimente; Frau I. Caspar für das
Tippen der Arbeit; und schließlich den Mitarbeitern
der Arbeitsgruppe H. Senger sowie den Angehörigen
des Fachbereichs Biologie - Botanik -, die mich wäh-
rend meiner Arbeit unterstützt haben.

Der Philipps-Universität Marburg und dem Fachbereich
Biologie danke ich für die Gewährung eines Graduierten-
stipendiums zur Promotionsförderung, wodurch mir ein
weiterführendes Studium ermöglicht wurde.

Meine akademischen Lehrer waren :

Buchholtz, Cleffmann, Dimroth, Geyer, Hartmann,
Henßen, Herrmann, Karlson, Kessel, Kellner, Kindl,
Klafky, Koch, Koecke, Kowallik, Lenski, Lindner,
Lingelbach, Lüdtke, Nultsch, Pfeil, Remane, Schmidt,
Scriba, Seitz, Senger, v. Stosch, Tent, Walcher,
Wehrmeyer, Wendt, Werner.

Lebenslauf

- 17.03.1943 geboren in Schweinfurt als Sohn des
Fleischermeisters Fritz Fleischhacker
und seiner Ehefrau Carola, geb. Schwender
- 1950 - 1954 Besuch der Volksschule in Dittershausen,
Schwalm-Eder-Kreis
- 1954 - 1955 Besuch der Mittelschule in Ziegenhain,
Schwalm-Eder-Kreis
- 1955 - 1956 Besuch der Schwalmschule (Gymnasium)
in Treysa, Schwalm-Eder-Kreis
- 1956 - 1965 Umzug nach Marburg/Lahn, Besuch der
Martin-Luther-Schule in Marburg/Lahn
- Februar 1965 Abitur
- April 1965- Wehrdienst in Stadt Allendorf und Idar-
März 1967 Oberstein
- 29.04.1966 Eheschließung mit Dorothea Seibert
- 16.10.1966 Geburt unseres Sohnes Christoph
- SS 1967 - Studium der Biologie und Leibesübungen
WS 1972/73 an der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
- Januar 1973 Wissenschaftliche Prüfung für das höhere
Lehramt (Staatsexamen)
- Februar 1973 - Beginn und Beendigung des ersten
Juli 1973 Semesters der Referendarausbildung in
Marburg/Lahn und Korbach
- Ab August 1973 Promotionsstipendium im Rahmen der
Graduiertenförderung

